





**FACULDADE DE MEDICINA**

**UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

## **Estudo Farmacogenético da Acção do Propofol no Sistema Energético Mitocondrial em Células Hela**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Anestesiologia e Terapêutica da Dor, realizada sob a orientação da Professora Doutora Maria Manuela Monteiro Grazina e co-orientação do Professor Doutor Joaquim Manuel Vieira da Silva Viana.

Copyright© 2010. Todos os direitos reservados.

**Teresa Alexandra Santos Carvalho Lapa**

**2010**

## **Agradecimentos**

Este trabalho não seria possível sem a contribuição de inúmeros intervenientes. A eles, expresso publicamente a minha gratidão:

À Professora Doutora Manuela Grazina, minha Orientadora, pelo entusiasmo e apoio constantes ao longo destes últimos anos e sobretudo pela amizade que foi crescendo com o desenvolver deste projecto. Pelas suas sapientes orientações e sugestões no plano técnico-científico e motivação que me transmitiu ao longo de todo este processo. Por tudo isto, e também pelo privilégio de ter privado com a Mulher para além de emérita Professora a quem muito devo, gostaria de lhe agradecer com um muito sincero Obrigada

À Professora Doutora Catarina Resende, Directora do Instituto de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Coimbra e Presidente do Centro de Neurociências e Biologia Celular, por ter permitido a realização do trabalho laboratorial que conduziu a esta dissertação.

Ao Professor Doutor Joaquim Manuel Vieira da Silva Viana pelo incentivo na participação no Mestrado em Anestesiologia e Terapêutica da Dor.

Às Marta Simões, Maria João Santos, Cândida, Daniela Luís e Cândida Mendes, pelo trabalho técnico realizado, relacionado com a cultura celular, avaliação da cadeia mitocondrial e análise do mtDNA.

Aos restantes elementos do Laboratório de Bioquímica Genética do Centro de Neurociências e Biologia Molecular, agradeço a disponibilidade e colaboração manifestadas sem as quais a realização deste trabalho não teria sido possível.

À minha família e amigos, um agradecimento muito especial pelo apoio e incentivo que me deram.

Ao meu marido e à minha Joana que nasceu durante este trabalho.

## Abreviaturas

Abreviatura	Nome completo
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATPase	ATP sintetase
AVC	Acidente Vascular Cerebral
$\beta$ 2M	$\beta$ -2-microglobulina
CAT	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou Ciclo de Krebs
CH <sub>2</sub>	Ubiquinol
CoQ	Coenzima Q
COX	Citocromo C oxidase, complexo IV da CRM
CRM	Cadeia Respiratória Mitocondrial
CS	Citrato Sintetase
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DCA	Ácido deosoxicólico
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAD	Flavina-adenosina dinucleótido
GABA	Ácido gama aminobutírico
H <sup>+</sup>	Ião Hidrogénio
HC	Cadeia Pesada
LC	Cadeia Leve

LDH	Lactato Desidrogenease
MAC	Concentração alveolar mínima
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MC1R	Gene do receptor da melanocortina
MME	Membrana mitocondrial externa
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
MMI	Membrana mitocondrial interna
MPT	Permeabilidade de transição mitocondrial
mtDNA	DNA mitocondrial
nDNA	DNA nuclear
NMDA	N-metil-D-aspartato
NQR	NADH desidrogenase, Complexo I da CRM
O <sub>2</sub>	Molécula de oxigénio
OXPHOS	<i>Oxidative phosphorylation</i>
PARP	Poli- ADP ribose polimerase
PCR	Polymerase chain reaction
PDH	Piruvato desidrogenase
pH	Potencial hidrogeniónico
Pi	Fosfato inorgânico
Q	Ubiquinona
QCCR	Ubiquinol-citocromo c redutase ou complexo III da CRM
QH <sub>2</sub>	Ubiquinol
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>r</sub>	RNA ribossômico
RNA <sub>t</sub>	RNA transportador

ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SIP	Síndrome de Infusão do propofol
SNC	Sistema Nervoso Central
SQDR	Succinato-quinona DCPIP redutase

## **Objectivos**

Estudar os efeitos produzidos pela exposição a um anestésico endovenoso, o propofol, usando a linha celular Hela como modelo celular, ao nível de:

1. Toxicidade celular
2. Função dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial (CRM)
3. Efeitos epigenéticos ao nível do genoma mitocondrial (mtDNA)



## Resumo

A prática anestésica tem sugerido que existe uma grande heterogeneidade nas necessidades anestésicas, na forma como decorre o pós-operatório e nos efeitos secundários aos fármacos anestésicos. Com o avanço dos conhecimentos na área da farmacogenómica tornou-se evidente que algumas destas diferenças podem ser explicadas por factores genéticos.

A farmacogenética descreve a forma como as alterações nos genes moduladores da acção dos fármacos estão relacionadas com a variabilidade na resposta interindividual à terapêutica ou ao aparecimento de efeitos secundários, ou mesmo tóxicos.

Os anestésicos gerais têm uma apresentação altamente lipossolúvel e conseguem atravessar todas as membranas, penetrar nos organelos e interagir com numerosos constituintes celulares. Parecem interferir com a expressão genética, com a síntese proteica e com a função celular, através de mecanismos que ainda permanecem por esclarecer.

O propofol é o anestésico endovenoso mais utilizado. Os anestésicos endovenosos podem interferir com o metabolismo dos hidratos de carbono, o consumo de oxigénio e a produção de energia no sistema nervoso. No entanto, a forma como alteram a função mitocondrial não está bem clarificada.

A mitocôndria é reconhecida como a maior fonte de energia necessária para a actividade celular normal. A função mitocondrial depende de proteínas codificadas, quer pelo DNA nuclear quer pelo mtDNA e, portanto, um funcionamento normal da cadeia respiratória requer um genoma mitocondrial intacto.

A mitocôndria representa um alvo de estudo da toxicidade farmacológica, uma vez que tem um papel fulcral na produção de energia celular e contém múltiplas vias metabólicas. A noção de que muitos fármacos utilizados na

prática clínica interferem com a bioenergética mitocondrial fez com que este organelo seja utilizado como um bio-sensor na predição da segurança de determinados fármacos.

O propofol é um composto lipofílico que pode penetrar livremente pela MMI, acumulando-se no interior da mitocôndria e alterando a sua função. Os desacopladores da OXPHOS são caracterizados por serem ácidos fracos hidrofóbicos (fenóis ou amidas). O propofol tem uma estrutura fenólica e poderá funcionar como desacoplador.

Com base nestes pressupostos, procedemos à avaliação da toxicidade do propofol a nível do sistema energético mitocondrial e da sua interferência no número de cópias de mtDNA.

A célula HeLa foi utilizada como linha celular para o estudo dos mecanismos de toxicidade do propofol. Estas células foram cultivadas em concentrações crescentes de propofol, em dois tempos de incubação, 15 minutos e 1 hora.

Foi avaliada a viabilidade celular pela medição da actividade da LDH libertada. Verificou-se que a exposição às diferentes concentrações de Propofol não teve efeito na LDH libertada e que quanto mais prolongada foi a exposição, menor a libertação de LDH.

Os efeitos encontrados na actividade dos diferentes complexos da CRM, para a exposição a diferentes concentrações de propofol não foi linear, verificando-se um comportamento heterogéneo.

Concentrações elevadas de propofol induzem redução do número de cópias de mtDNA, tendo-se verificado uma redução estatisticamente significativa entre a concentração 4 e a 100µg/ml,  $p=0,028$ . Esta redução do número de cópias é independente do tempo de exposição.

## **Palavras-chave**

Anestesia

Propofol

Cadeia Respiratória Mitocondrial

Farmacogenética

DNA mitocondrial

# Índice:

Índice de Tabelas: .....	2
Índice de Figuras: .....	3
1. Introdução .....	6
1.1. Os anestésicos Gerais – características principais .....	7
1.1.2. O propofol .....	8
1.2. Mecanismos de acção dos anestésicos .....	10
1.3. A Mitocôndria e a produção de energia .....	12
1.3.1. A cadeia respiratória mitocondrial .....	15
1.3.2. Produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) .....	19
1.3.3. O genoma Mitocondrial (mtDNA) .....	19
1.4. Toxicidade mitocondrial induzida por fármacos .....	24
2. Material e métodos .....	37
2.1. Cultura das Células HeLa .....	38
2.1.1. Exposição das Células aos Anestésicos .....	38
2.2. Avaliação da viabilidade celular .....	39
2.3. Avaliação espectrofotométrica da actividade dos complexos da CRM ..	39
2.4. Determinação da concentração proteica .....	40
2.6. Análise de número de cópias do mtDNA .....	41
2.7. Avaliação da morte celular por apoptose .....	41
2.8. Análise Estatística .....	42
3. Resultados .....	43
3.1 Influência do propofol na libertação de LDH .....	44
3.2. Influência do propofol na OXPHOS .....	49
3.2.1 Actividades dos Complexos da CRM em valor absoluto .....	49
3.2.2 Actividades dos complexos da CRM corrigidas para a CS .....	70
3.3 Influência do propofol na morte celular por apoptose .....	89
3.4 Influência do propofol no número de cópias do mtDNA .....	90
4. Discussão .....	95
5. Conclusões finais .....	105
6. Bibliografia .....	108

## Índice de Tabelas:

Tabela 1 - Resultados da avaliação da actividade da LHD, em resposta à incubação com diferentes concentrações de propofol, em dois tempos de exposição. ....	44
Tabela 2 - Resultados da avaliação da actividade dos complexos da CRM, em resposta à incubação com diferentes concentrações de propofol, em dois tempos de exposição. ....	49
Tabela 3 - Resultados das actividades dos complexos da CRM corrigidas para a CS, em resposta à incubação com diferentes concentrações de propofol, em dois tempos de exposição. ....	70
Tabela 4 - Resultados da avaliação do número de cópias mtDNA, em resposta à incubação com diferentes concentrações de propofol, em dois tempos de exposição. ....	90

# Índice de Figuras:

Figura 1 - Representação da estrutura química do propofol. ....	8
Figura 2 – Representação esquemática da estrutura mitocondrial .....	12
Figura 3 - Representação esquemática do processo de fosforilação oxidativa. ....	14
Figura 4 - A cadeia respiratória mitocondrial e o processo de fosforilação oxidativa. ....	16
Figura 5 - Genoma mitocondrial humano. ....	20
Figura 6 - Representação dos alvos moleculares da toxicidade molecular induzida por fármacos. ....	26
Figura 7 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança para a LDH Libertada, em cada tempo de observação, segundo as cinco concentrações de Propofol. ....	45
Figura 8 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança para a LDH Libertada, em cada concentração de Propofol. ....	46
Figura 9 – Representação da percentagem de LDH para cada uma das concentrações em relação ao controlo .....	47
Figura 10 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança para a LDH Libertada, em cada concentração de Propofol. ....	48
Figura 11 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança do complexo I, em cada concentração de propofol, nos dois tempos de exposição. ....	51
Figura 12 - Representação gráfica tridimensional da superfície de resposta para Complexo I em função da concentração de propofol e do tempo de exposição. ....	53
Figura 13 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança do complexo II (SQDR), em cada concentração de propofol, nos dois tempos de exposição. ....	54
Figura 14 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança da actividade do complexo II, em cada concentração de propofol. ....	55

Figura 15 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança da actividade do complexo II, em cada tempo de exposição.....	56
Figura 16 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança actividade do complexo III, em cada concentração de propofol, segundo os dois tempos de observação. ....	58
Figura 17 - Representação gráfica tridimensional da superfície de resposta para a actividade do Complexo III em função da concentração de propofol e do tempo de exposição. ....	60
Figura 18 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança da actividade do complexo IV, em cada concentração de propofol, segundo os dois tempos de exposição.....	61
Figura 19 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança da actividade do complexo IV em cada concentração de propofol.....	62
Figura 20 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança da actividade do complexo V, em cada concentração de propofol, segundo os dois tempos de exposição.....	65
Figura 21 - Representação gráfica tridimensional da curva de resposta para CV em função da concentração de propofol e tempo.....	67
Figura 22 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança da Citrato Sintetase, em cada concentração de propofol, segundo os dois tempos de exposição.....	68
Figura 23 - Gráfico das médias amostrais e respectivos intervalos de confiança da CS, em cada concentração de propofol. ....	69
Figura 24 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança da relação Complexo I/CS, em cada concentração de propofol, segundo os dois tempos de exposição.....	72
Figura 25 - Representação gráfica tridimensional da superfície de resposta para a relação complexo I/CS em função da concentração de propofol e tempo de observação.....	74
Figura 26 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança da relação CII/CS, em cada concentração, segundo os dois tempos de observação. ....	76
Figura 27 - Representação gráfica tridimensional da superfície de resposta para a relação II/CS em função da concentração de propofol e tempo de observação. ....	78

Figura 28 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança para a relação Complexo III/CS, em cada tempo de observação, segundo as cinco concentrações de Propofol. ....	80
Figura 29 - Representação gráfica tridimensional da superfície de resposta para relação III/CS em função da concentração de propofol e tempo de observação. ....	82
Figura 30 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança para o a relação Complexo IV/CS, em cada tempo de observação, segundo as cinco concentrações de Propofol.....	84
Figura 31 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança para o a relação Complexo IV/CS, em cada tempo de observação, segundo as cinco concentrações de Propofol.....	86
Figura 32 - Representação gráfica tridimensional da superfície de resposta para relação V/CS em função da concentração de propofol e tempo de observação. ....	88
Figura 33 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança para o número de cópias mtDNA, em cada tempo de observação, segundo as cinco concentrações de Propofol. ....	91
Figura 34 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança para o número de cópias mtDNA, em cada concentração de Propofol. ....	92
Figura 35 - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança para o número de cópias mtDNA, em cada tempo de exposição. ....	93
Figura 36 - Representação da percentagem do nº de cópias mtDNA para cada uma das concentrações em relação ao controlo .....	94



# **1. Introdução**

## **1.1. Os anestésicos Gerais – características principais**

A descoberta da anestesia geral há 160 anos atrás revolucionou a prática da Medicina. A difusão crescente da anestesia geral tem promovido a sua utilização na Medicina moderna, em aplicações que vão desde pequenos procedimentos, como a realização de exames complementares de diagnóstico até às grandes intervenções cirúrgicas, como o transplante de órgãos.

Os anestésicos gerais podem ser agrupados em inalatórios e endovenosos, de acordo com a sua forma de administração. Os anestésicos administrados por via endovenosa estão mais bem caracterizados e, tendo em conta a sua natureza química, o estudo dos seus mecanismos de acção está mais desenvolvido. De entre os mais utilizados, destacam-se o propofol, o etomidato, o tiopental e a ketamina, sendo o propofol o mais utilizado.

No sentido de atingir o objectivo para o qual foram desenhados, os anestésicos gerais actuam em múltiplas vias moleculares, com alvos localizados em diferentes estruturas anatómicas do sistema nervoso central. Os mecanismos de acção dos anestésicos gerais ainda não estão bem esclarecidos (Hemmings et al., 2005) e continuam a ser um grande desafio de investigação em diversas áreas, como a Bioquímica Genética ou mesmo a Farmacologia. A maior parte dos conhecimentos actuais sobre os mecanismos de acção dos anestésicos gerais surgiram nos últimos anos, com base em estudos genéticos.

Todos os anos, no mundo inteiro, milhões de pessoas são expostas a fármacos anestésicos. Tem sido assumido que os efeitos dos anestésicos são profundos e imediatos mas completamente reversíveis e que, portanto, o cérebro volta ao seu estado pré-anestésico assim que os fármacos são eliminados e o doente acorda. Nos últimos anos, este pressuposto tem sido posto em causa, tendo sido publicados vários estudos que demonstram a ocorrência de apoptose neuronal associada aos anestésicos gerais. O estudo internacional da disfunção cognitiva pós-operatória estabeleceu a existência e prevalência de disfunção cognitiva pós-operatória como uma entidade clínica definida nos

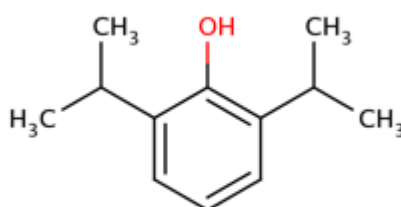
doentes idosos (Moller et al, 1998). Por outro lado, estudos recentes sugerem que a exposição aos anestésicos gerais por períodos curtos, na infância podem estar associados a dificuldades na aprendizagem (DiMaggio CJ et al., 2009; Wilder RT et al., 2009). Os mecanismos moleculares associados a estas alterações não foram ainda elucidados.

Desde que os anestésicos foram introduzidos no mercado, que têm surgido diversas questões relativamente à sua toxicidade. Com a evolução da genética, tornou-se possível estudar a toxicidade ao nível genético. Todos os fármacos têm efeitos benéficos e efeitos menos desejáveis. O importante é escolher o melhor anestésico com o menor efeito tóxico para o doente e com a maior eficácia.

### 1.1.2. O propofol

O propofol (2,6-disopropylphenol) (figura 1) é um anestésico geral de acção com curta duração. Desde a sua introdução no mercado nos anos 80, tem sido largamente utilizado na indução e manutenção da anestesia geral, para sedação, dentro e fora do bloco operatório e em cuidados intensivos.

Este fármaco, pertence ao grupo dos alquifenóis, que são óleos à temperatura ambiente, insolúveis em soluções aquosas e muito lipossolúveis. Apresenta-se como uma emulsão graças ao seu solvente lipídico, o *intralipid*.



**Figura 1** - Representação da estrutura química do propofol.  
[adaptado de <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00818>]

O propofol tem características farmacocinéticas que lhe permitem um início de acção rápido e uma eliminação célere do organismo. É rapidamente metabolizado no fígado por glucoronido-conjugação e pelas enzimas do citocromo P450, em compostos hidrossolúveis excretados pelo rim, na urina.

Trata-se de um fármaco com múltiplas vantagens, uma vez que tem poucos efeitos secundários conhecidos, com início e duração de acção muito rápidos, tornando o nível de anestesia facilmente controlável.

Além das múltiplas vantagens como anestésico, tem múltiplos efeitos não anestésicos. A sua utilização está associada a uma diminuição da incidência de náuseas e vômitos (Dandoy et al., 1990; Jost et al., 1997; McCollum et al., 1988). Tem actividade imunomodulatória (Hokey et al., 2005) e é um potente anti-oxidante (Marthy-Harter et al., 2000). Múltiplos estudos, *in vivo* e *in vitro*, têm revelado propriedades neuroprotectoras (Engelhard et al., Gelb et al., 2002).

O propofol diminui, tanto o fluxo sanguíneo cerebral como a taxa metabólica cerebral de forma dose-dependente. O seu efeito neuroprotector em modelos animais é atribuído às suas propriedades anti-oxidantes, potenciação da inibição da transmissão sináptica do GABA-A e inibição da libertação de glutamato.

Uma vez que é muito pouco solúvel em água, é apresentado como uma emulsão lipídica, o que pode ser prejudicial quando utilizado para anestesia total endovenosa e em sedações muito prolongadas. Está a ser estudada uma nova formulação de propofol ou GPI 15715 ou fosfopropofol, que é um pró-fármaco hidrossolúvel.

Apesar de ser um anestésico muito utilizado, os estudos relativos á sua toxicidade e genotoxicidade são muito escassos.

## **1.2. Mecanismos de acção dos anestésicos**

Apesar da sua utilização de rotina na prática anestésica, os mecanismos de acção dos anestésicos ainda não estão bem esclarecidos.

Há mais de um século atrás, Meyer et al. (1899) e Overton et al. (1901) constataram, de forma independente, que a potência dos anestésicos gerais estava directamente relacionada com a sua hidrofobicidade. Foi devido a esta observação que, durante grande parte do último século, se pensou que o local de acção dos anestésicos gerais seria ao nível da membrana celular (Hemmings et al., 2005).

A hipótese das proteínas serem um alvo directo dos anestésicos, é uma sugestão relativamente recente (Moss et al., 1991). Surgiu uma teoria que apontava para o facto dos anestésicos serem substâncias que actuavam sem a intervenção de receptores, mas esta hipótese foi rapidamente rejeitada (Hemmings et al., 2005).

Durante a última década houve um progresso significativo no esclarecimento dos mecanismos de acção dos anestésicos gerais a nível celular e molecular, em particular no sistema nervoso central. Foram documentadas evidências de que diferentes mecanismos moleculares estão envolvidos na acção dos anestésicos, em múltiplas áreas cerebrais (Burnie et al., 1981). Verificou-se ainda que os receptores dos neurotransmissores GABA e glutamato são modulados pela maioria dos anestésicos, quer ao nível sináptico quer extra-sináptico (Hemmings et al., 2005). A depressão da transmissão excitatória mediada pelo glutamato e a potenciação da transmissão inibitória pelo GABA parecem estar na base dos mecanismos primários de actuação (Westphalen et al., 2003).

O mecanismo de acção exacto do propofol no SNC não está totalmente elucidado; no entanto, existem evidências de que o seu efeito hipnótico é mediado pela ligação aos receptores GABA-A (Krasowskia et al., 2001). O

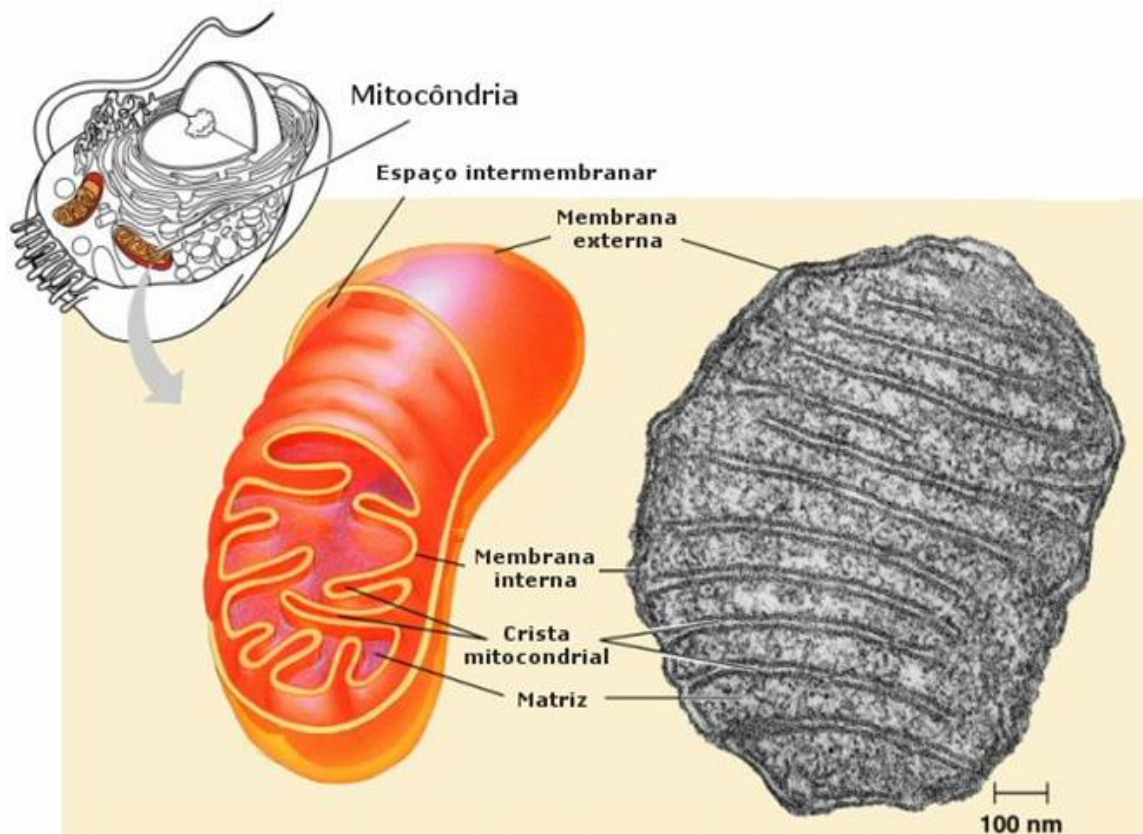
propofol inibe a libertação de acetilcolina no hipocampo e no córtex pré-frontal, através da sua acção nos receptores GABA A, (Kikuchi et al., 1998). Por outro lado, inibe os receptores NMDA, através da modulação dos canais de sódio (Lingamaneni et al., 2001); uma das acções que também parece contribuir para o seu efeito no SNC.

Srivatsan et al, (2009) estudaram a capacidade do propofol para induzir a transcrição de c-Fos e Egr-1 em células de neuroblastoma de rato, baseados no facto de que factores de transcrição como c-Fos, Egr-1, Nurr1 e Arc estão implicados na memória, aprendizagem e potenciação dos receptores GABA-A. Estes autores demonstraram que o propofol induz a transcrição de c-Fos e Egr-1 e que esta indução é independente do receptor GABA-A, mas está relacionada com a via das proteínas cinases activadas por mitogénios (MAPK, *mitogen-activated protein kinases*) e da cinase regulada por sinais extracelulares (ERK, *extracellular signal-regulated kinase*). Estes resultados sugerem a existência de uma via paralela nos mecanismos de acção dos anestésicos gerais.

Como a maior parte das funções neurofisiológicas são dependentes de energia, muitos autores consideram ser muito provável que o sistema energético mitocondrial esteja envolvido no mecanismo de acção dos anestésicos.

### 1.3. A Mitocôndria e a produção de energia

As mitocôndrias são organelos presentes na maioria das células eucariotas que têm semelhanças estruturais com os procariotas. São compostas por uma matriz rodeada de duas membranas; membrana mitocondrial interna (MMI) e membrana mitocondrial externa (MME). A MMI contém múltiplas invaginações denominadas cristas e é altamente permeável a pequenas moléculas e iões, que necessitam de transportadores proteicos específicos para entrar e sair da matriz mitocondrial (figura 2).



**Figura 2** – Representação esquemática da estrutura mitocondrial  
[Adaptado de [www.flaviocarreto.bio.br](http://www.flaviocarreto.bio.br)]

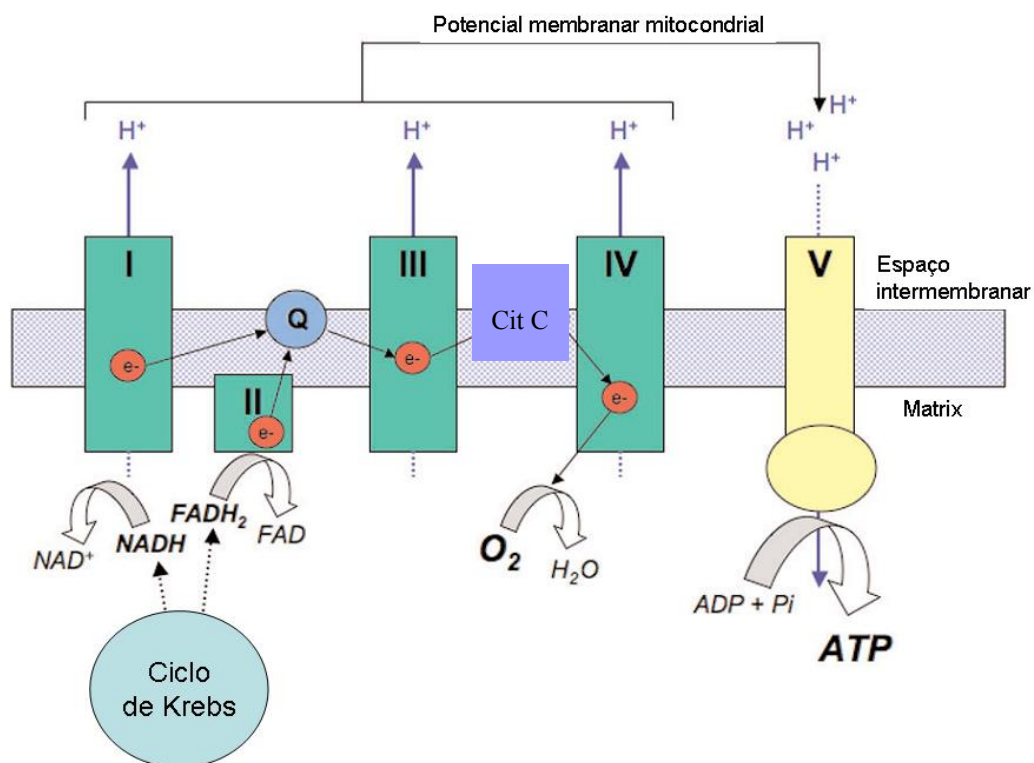
A composição lipídica da MMI é única pelo facto de conter uma elevada concentração de moléculas de cardiolipina e baixo teor de colesterol. A manutenção da sua integridade é crucial para a função mitocondrial.

A matriz mitocondrial, delimitada pela MMI, contém um grande número de enzimas, ribossomas, RNAr, RNAt e várias cópias de DNA mitocondrial; encontramos também o complexo da piruvato desidrogenase (PDH) e as enzimas do ciclo de Krebs, a via da beta-oxidação dos ácidos gordos e vias de metabolização dos aminoácidos, entre outros. Em resumo, uma grande parte das vias de oxidação de nutrientes tem a participação da mitocôndria, excepto a glicólise, que ocorre no citosol.

De entre as várias vias metabólicas de extrema importância, que ocorrem na mitocôndria, destaca-se o processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS), que faz com que seja considerada uma espécie de “central energética” da célula, pois é através deste processo metabólico que são produzidas a maior parte das moléculas de ATP. Este, ao ser degradado, liberta uma grande quantidade de energia, tornando possíveis muitas reacções químicas que, de outro modo, não ocorreriam. Habitualmente, a OXPHOS é referida como a via principal de produção de energia na célula. As enzimas que constituem esta via metabólica estão organizadas em grandes complexos enzimáticos constituídos por um grande número de peptídeos, organizados num sistema que habitualmente se designa por cadeia respiratória mitocondrial (CRM) (Grazina, 2004).

O processo de OXPHOS (figura 3) é o culminar de uma série de reacções bioquímicas para a formação de energia pelo metabolismo, em organismos aeróbios. Todos os passos oxidativos, na degradação de hidratos de carbono, gorduras e aminoácidos convergem, nesta fase final de respiração celular, na qual a energia de oxidação conduz à síntese de ATP (Grazina, 2004).





**Figura 3** - Representação esquemática do processo de fosforilação oxidativa.

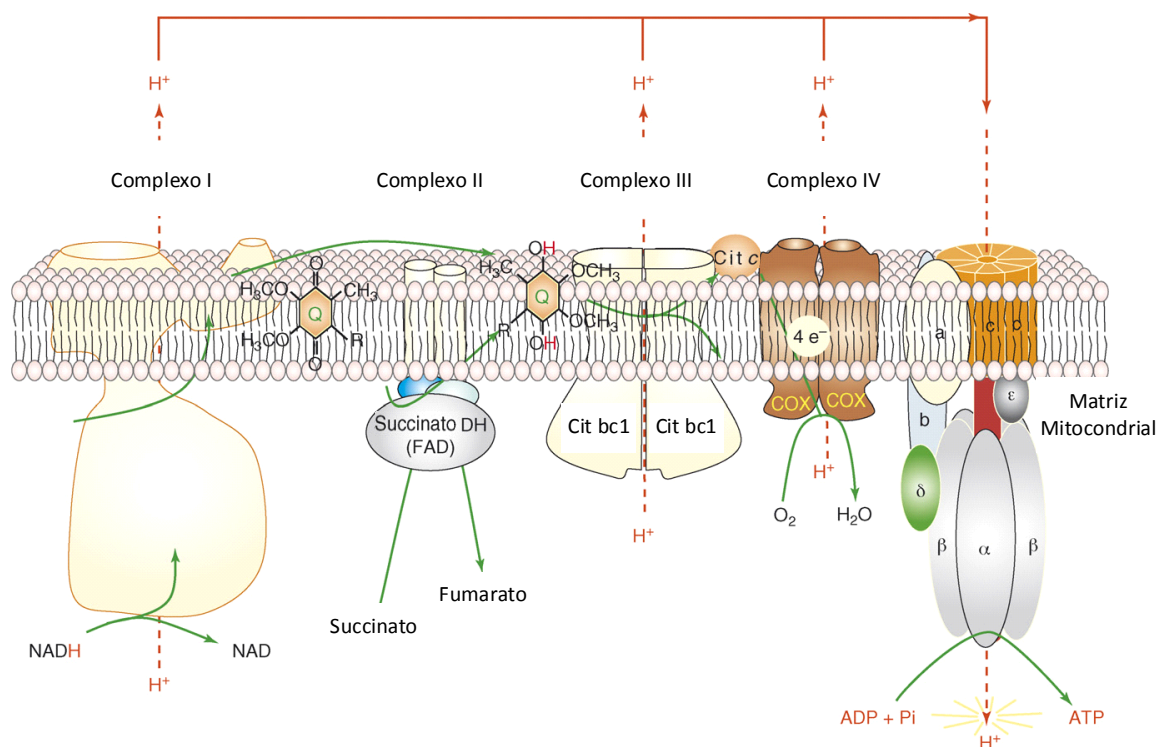
Abreviaturas: I – complexo I, II – Complexo II, III – complexo III, IV – Complexo IV, V – Complexo V, Q – Ubiquinona, ATP – Adenosina –trifosfato, O<sub>2</sub> – molécula de oxigênio, H<sub>2</sub>O – molécula de água, NAD – nicotinamida adenina dinucleotídeo, NADH – NAD reduzida, FAD – flavina adenina dinucleotídeo, FADH<sub>2</sub> – FAD reduzida [Adaptado de Protti et al., 2006].

A mitocôndria tem um papel fundamental na saúde e na doença. Para além da produção de ATP, este organelo participa em outras funções importantes, nomeadamente na regulação dos níveis de cálcio citoplasmático, controlo do ciclo celular, bem como a regulação da morte celular programada por apoptose.

### **1.3.1. A cadeia respiratória mitocondrial**

A cadeia respiratória mitocondrial (figura 4) catalisa a oxidação de vários substratos com transferência de electrões até ao oxigénio. As enzimas da CRM estão organizadas em cinco grandes complexos polipeptídicos, localizados na MMI, que constituem a maquinaria de síntese de ATP, pelo processo de OXPHOS, a partir da transferência de electrões entre os vários complexos enzimáticos e transportadores intermediários (coenzima Q ou ubiquinona e citocromo c) até ao O<sub>2</sub>, ao nível da COX, convertendo-o em H<sub>2</sub>O (Grazina, 2004).

Os complexos multi-enzimáticos que transportam electrões na CRM estão organizados em complexos supramoleculares embebidos na membrana e que podem ser fisicamente separados. Tratamentos suaves da MIM com detergentes permitem a dissolução dos 4 complexos transportadores de electrões, cada um capaz de catalizar a transferência de electrões através de uma porção da cadeia. Os complexos I (NQR) e II (SQDR) catalizam a transferência de electrões para a Coenzima Q (CoQ), a partir de dois dadores diferentes: NADH (NQR) e succinato (SQDR). O complexo III (QCCR) transporta os electrões da CoQ para o citocromo c, e o complexo IV (COX) completa a sequência, transferindo electrões do citocromo c para o O<sub>2</sub> (Grazina, 2004).



**Figura 4** - A cadeia respiratória mitocondrial e o processo de fosforilação oxidativa.  
[Adaptado de Kendall et al., 2008]

O maior dos complexos da CRM é a NADH desidrogenase ou complexo I, constituído por cerca de 42 cadeias peptídicas diferentes, 7 das quais codificadas pelo genoma mitocondrial, incluindo uma flavoproteína e pelo menos 6 centros Fe-S. Extrai energia do NADH, produzida pela oxidação dos açúcares e gorduras e cataliza simultânea e obrigatoriamente dois processos acoplados: a transferência exergónica para a CoQ de dois electrões provenientes da oxidação do NADH e a transferência endergónica de 4 protões da matriz para o espaço intermembranar. Este complexo é, portanto, uma bomba de protões, accionada pela energia libertada na transferência de electrões. A forma completamente reduzida da CoQ, QH<sub>2</sub> (ubiquinol), difunde-se na MMI, entre os complexo I e III onde é oxidado para Q (Ubiquinona) num processo que também envolve movimento externo de H<sup>+</sup> (Grazina, 2004).

A diminuição da actividade do complexo I pode alterar a disponibilidade de ATP nas células e consequentemente uma miríade de funções celulares será alterada.

O complexo I tem um papel crucial na produção de energia na célula, e alterações na sua função estão relacionadas com um vasto leque de doenças neuromusculares (Grazina, 2004).

Este complexo é o mais vulnerável á toxicidade por diferentes tipos de fármacos ou substâncias tóxicas. É inibido por mais de 60 famílias de diferentes compostos desde a rotenona até um vasto número de insecticidas. A estrutura deste complexo e a sensibilidade aos inibidores varia de espécie para espécie. Em mamíferos, as mitocôndrias dos neurónios são as mais sensíveis aos inibidores do complexo I.

O complexo II, localizado na face interna da MMI, participa simultaneamente em duas vias metabólicas, a OXPHOS e o Ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Nelson & Cox, 2000). Apesar de mais pequena e simples do que o complexo I, a SQDR contém 2 tipos de grupos prostéticos e pelo menos 4 proteínas diferentes. Uma das proteínas tem um FAD (Flavina-adenosina dinucleótido) ligado covalentemente e um centro Fe-S com 4 átomos de Fe, estando presente também uma segunda proteína Fe-S. Os electrões são cedidos pelo succinato (convertido a fumarato) ao FAD, sendo depois transferidos, através dos centros Fe-S, para a CoQ (Grazina, 2004).

O Complexo III, também chamado citocromo *bc1*, acopla a transferência de electrões do QH<sub>2</sub> para o citocromo c com o transporte vectorial de protões da matriz para o espaço intermembranar (Grazina, 2004).

O citocromo c é uma proteína solúvel do espaço intermembranar. Após aceitar um electrão no seu único heme, vindo do complexo III, o citocromo c move-se para o complexo IV cedendo o electrão ao nível do centro binuclear de cobre.

No passo final da transferência de electrões na CRM, o complexo IV (Nelson & Cox, 2000), transporta electrões do citocromo c para o oxigénio molecular,  $O_2$ , reduzindo-o a  $H_2O$ .

Por cada 4 electrões que atravessam este complexo, a enzima consome 4  $H^+$  da matriz convertendo o  $O_2$  em  $2H_2O$ . A energia desta reacção redox é usada para bombear um protão para o espaço intermembranar, por cada electrão que transfere, em adição aos protões que são bombeados através dos complexos I e III (Grazina, 2004).

O complexo V, ou ATP sintetase, de grandes dimensões, está também inserido na MMI e cataliza a formação de ATP a partir de ADP e  $P_i$ , acompanhada pelo fluxo de protões através da MMI. A energia electroquímica inerente à diferença de concentração de protões e separação de carga através da MIM, a força proto-motriz, conduz à síntese de ATP, ao mesmo tempo que os protões fluem passivamente, de volta ao interior da matriz, através de um poro de protões associado à ATPase (Grazina, 2004).

### **1.3.2. Produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS)**

Além da regulação da produção de ATP, a cadeia transportadora de electrões é importante na produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), que ocorre quando o oxigénio molecular capta apenas um electrão.

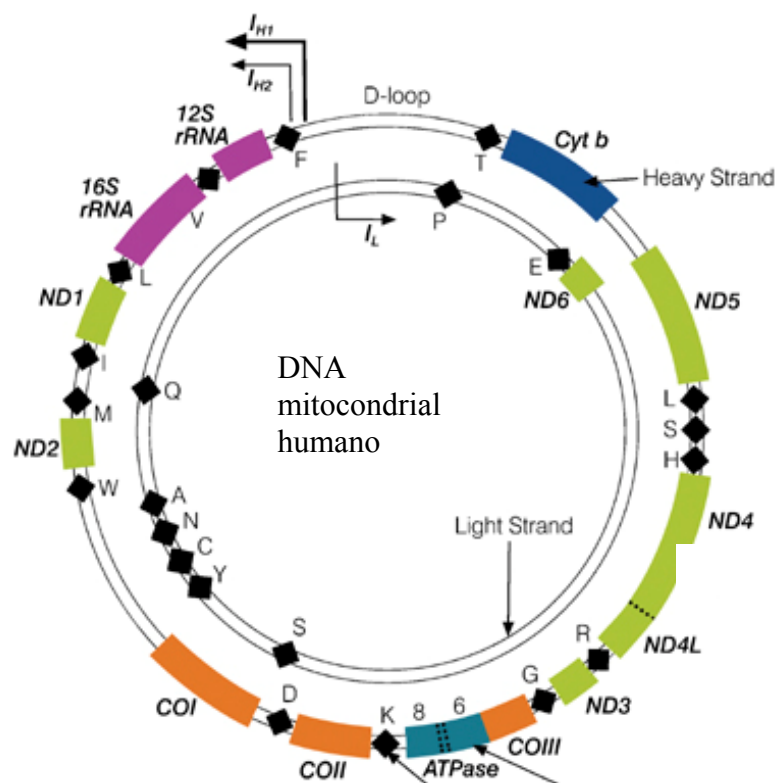
As principais ROS mitocondriais são o anião superóxido e o peróxido de hidrogénio que são continuamente gerados como produtos do metabolismo aeróbio normal (Chance et al., 1979). Os complexos I e II estão envolvidos na produção de ROS.

Quando a produção de ROS excede a capacidade de defesa anti-oxidante ocorre stresse oxidativo que pode originar lesão mitocondrial e levar à morte celular.

### **1.3.3. O genoma Mitocondrial (mtDNA)**

As mitocôndrias são os únicos organelos fora do núcleo que contêm DNA. O genoma mitocondrial (mtDNA) é uma estrutura circular composta por 16.568 pares de bases (figura 5) (Grazina, 2004). Dado que existem cerca de 1000 mitocôndrias em cada célula e cada mitocôndria contém várias cópias (2-10) de mtDNA, podem existir cerca de  $10^3$ - $10^4$  moléculas de mtDNA idênticas numa única célula, com excepção dos espermatozóides e ovócitos, (Satoh & Kuroiwa, 1991).

A sequência completa e a organização do mtDNA humano ficaram a ser conhecidas no início dos anos 80 (Andersen et al., 1981), embora a sua estrutura já fosse conhecida, tratando-se de uma molécula circular de dupla cadeia (cadeia leve (LC) e cadeia pesada (HC), devendo a sua denominação ao conteúdo em desoxirribonucleótidos de guanina-citosina, mais elevado na cadeia H).



**Figura 5** - Genoma mitocondrial humano.  
[Adaptado de Kyriakouli e tal, 2008]

O mtDNA humano codifica 13 peptídeos da CRM (7 subunidades do complexo I, o citocromo b, que faz parte do complexo III, 3 peptídeos do complexo IV e 2 subunidades do complexo V), para além de 22 tRNAs e 2 rRNAs, necessários à síntese proteica mitocondrial (Attardi and Schatz, 1988; transcrito de Grazina, 2004).

A função mitocondrial depende de proteínas codificadas quer pelo DNA nuclear quer pelo mtDNA e portanto, um funcionamento normal da cadeia respiratória requer um genoma mitocondrial intacto (Schefter, 1999).

A função do mtDNA celular depende do número de cópias, que é da ordem dos milhares em culturas de células de mamíferos, e da integridade de cada molécula de mtDNA.

As alterações patogénicas do mtDNA incluem mutações pontuais, rearranjos (delecções/ inserções) e redução drástica do número de cópias (deplecção) (Münnich et al., 2001a). Até ao momento, existem mais de 100 mutações pontuais do mtDNA descritas como patogénicas (MITOMAP, 2004), que atingem, tanto os genes rRNA e tRNA, ao nível da síntese proteica mitocondrial, bem como os genes codificantes dos peptídeos da CRM, podendo afectar a actividade dos vários complexos em ambos os casos (Grazina, 2004).

O estudo do mtDNA tem-se difundido nos últimos anos não só em estudos de toxicidade mas também em estudos de evolução humana, migração e história das populações. Esta generalização do estudo do mtDNA deve-se a características únicas como elevado número de cópias, transmissão materna, ausência de recombinação e maior taxa de mutações do que o DNA nuclear (Grazina, 2004).

#### **1.3.3.1 A replicação do genoma mitocondrial**

A regulação da replicação do DNA mitocondrial é um dos principais factores implicados na biogénese mitocondrial. Apesar dos enormes progressos que se têm verificado em relação ao conhecimento da biologia molecular, ainda há muitas lacunas na compreensão da regulação do genoma mitocondrial.

O mtDNA sofre replicação por acção da DNA polimerase, que também tem capacidade de revisão e excisão de um nucleótido quando houver erro na sua inserção. A replicação do mtDNA não coincide com o ciclo celular e ocorre independentemente da replicação do DNA nuclear (Bogenhagen & Clayton, 1977). Todos os factores associados à replicação do DNA mitocondrial são



codificados pelo DNA nuclear, indicando portanto que o núcleo tem um papel importante na regulação do número de cópias de DNA mitocondrial.

Quando há uma mutação no mtDNA, cria-se uma população mista de mtDNA normal e mutante. Assim, as cópias de mtDNA em cada indivíduo não são todas iguais e a existência de diferentes tipos de mtDNA num indivíduo designa-se por heteroplasmia. Outra característica do mtDNA é o facto de ter transmissão exclusivamente materna. Quando uma célula heteroplásmica se divide, os mtDNAs são distribuídos aleatoriamente pelas células filhas, resultando em “mosaicos” de mtDNA, relativamente ao seu conteúdo em moléculas mutantes vs *Wild type*.

O elevado número de cópias de mtDNA associado à sua localização extracelular, tornam o mtDNA acessível para análise e na molécula de escolha para estudos. Mas, muito pouco se sabe acerca dos mecanismos de monitorização do número de cópias de mtDNA.

Existem dois métodos diferentes para avaliar alterações relacionadas com o mtDNA. Os métodos qualitativos são baseados na análise de sequenciação e são o melhor método para identificar mutações específicas e deleções longas. Os métodos quantitativos, utilizando a PCR em tempo real, permitem quantificar o número de cópias de mtDNA.

A forma como o número de cópias de mtDNA é regulado é de particular interesse devido ao sistema genético único da mitocôndria.

O número de cópias de mtDNA não é aleatório, é específico de cada tipo de tecido e do estado de desenvolvimento. No entanto, ainda não é claro o modo como é regulado o número de cópias. Há múltiplos modelos de regulação propostos. Alguns defendem que o número de cópias depende das necessidades de ATP; outros defendem que é a disponibilidade de nucleótidos que regula a replicação do mtDNA (Tang et al., 2000).

Qualquer factor necessário à transcrição ou replicação do mtDNA pode estar envolvido na regulação do número de cópias do mtDNA.

A alteração no número de cópias de mtDNA está associada a algumas doenças como alterações neurogénicas da infância, hipotonia, atrasos no desenvolvimento na criança, esclerose múltipla (Blokhin et al., 2008), carcinoma de células renais, diabetes, doença hepática, cardiomiopatia, entre outras. A diminuição do número de cópias foi também associada à idade (Laderman et al., 1996).

A redução do número de cópias de mtDNA e disfunção mitocondrial é um problema que ocorre com o uso alguns fármacos, como os anti-retrovirais, que estão entre os mais bem estudados.

#### **1.3.4. A morte celular por apoptose**

A morte celular por apoptose caracteriza-se por uma redução do volume da célula, com condensação do núcleo e do citoplasma, em que a cromatina condensada se distribui junto à membrana nuclear, com fragmentação do DNA, formando oligonucleossomas. Os organelos são, geralmente, preservados até à fragmentação da célula, formando-se corpos apoptóticos, constituídos por fragmentos celulares rodeados por uma membrana, que são posteriormente fagocitados. O estado metabólico da célula pode ser determinante para a entrada da célula em apoptose. A morte celular por apoptose está associada à activação de caspases. Nos mamíferos, as caspases são frequentemente activadas como resultado da permeabilização da membrana mitocondrial, através de um fenómeno denominado permeabilidade de transição mitocondrial (MPT), levando à libertação de proteínas activadoras de caspases, citocromo c, outras caspases e Smac- $\alpha$ /DIABLO (Grazina, 2004).

## **1.4. Toxicidade mitocondrial induzida por fármacos**

A biogénese mitocondrial é um processo complexo, envolvendo uma série de vias sinalizadoras que regulam a expressão do genoma nuclear e mitocondrial.

Dada a importância da mitocôndria para o estado energético e homeostasia celular, não é surpreendente que um défice na CRM seja prejudicial ao funcionamento da célula. Existem vários fármacos que interferem com a função mitocondrial. A multiplicidade de mecanismos de toxicidade mitocondrial complica-se pelo facto da mitocôndria ter o seu próprio genoma que codifica 13 proteínas da CRM, 2 rRNA e 22 tRNA.

A mitocôndria acumula facilmente compostos lipofílicos catiónicos e ácidos fracos na sua forma aniónica. Estes compostos podem penetrar livremente pela MMI, acumulando-se no interior da mitocôndria e alterando a função mitocondrial.

A maioria das células contém um elevado número de mitocôndrias, o que permite alguma reserva funcional, sendo que, a lesão celular ou disfunção irá ocorrer quando um número suficiente de mitocôndrias está irreparavelmente afectado e a célula não consegue produzir energia suficiente.

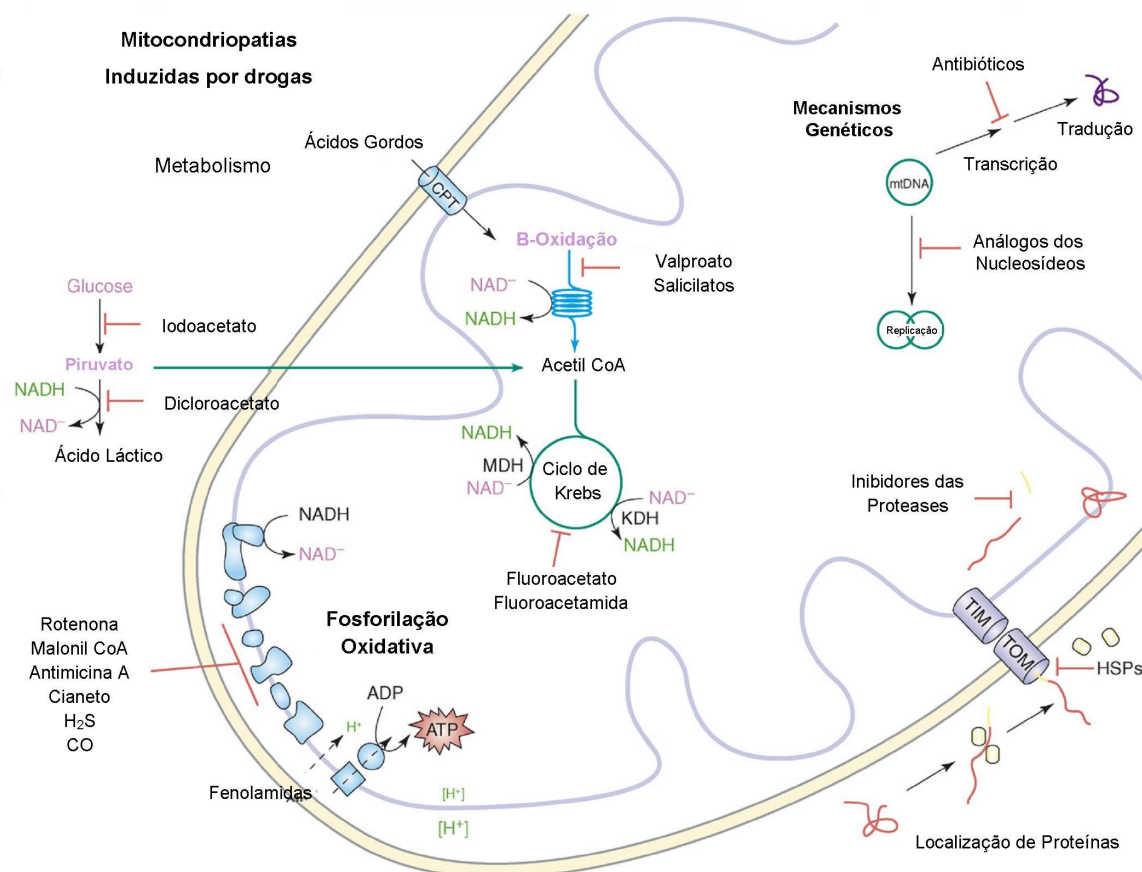
Os principais mecanismos de toxicidade dos fármacos a nível mitocondrial são por interferência directa na fosforilação oxidativa, inibição da oxidação dos ácidos gordos, inibição da replicação/transcrição do mtDNA e também por interferência com a síntese de proteínas (Kendall et al., 2008) (Figura 6).

Os inibidores da cadeia transportadora de electrões incluem rotenona, antimicina A, cianeto e monóxido de carbono. Ao inibirem o transporte de electrões, estes agentes inibem o substracto de oxidação e o consumo de oxigénio, o que pode culminar em acidose láctica, acumulação lipídica e hipoglicémia. Por outro lado, os desacoploadores da fosforilação oxidativa colapsam o gradiente de pH e o potencial eléctrico através da MMI,

estimulando a oxidação de substratos e o consumo de oxigénio. O resultado é a depleção de ácidos gordos e hipoxia. A energia gerada pelo gradiente protoeléctrico, no desacoplamento é dissipada como calor, não sendo usada para a síntese de ATP. Enquanto para os inibidores da cadeia transportadora de electrões existe pouca correlação estrutural, os desacopladores da OXPHOS são caracterizados por serem ácidos fracos hidrofóbicos (fenóis ou amidas) (Kendall et al., 2008).

Os inibidores que actuam directamente na cadeia transportadora de electrões têm sido utilizados como pesticidas e incluem rotenoides, cianidos, sulfito de hidrogénio e muitos outros. No entanto, a maioria destas evidências é baseada em estudos *in vitro* em partículas submitocondriais isoladas, o que pode colocar em questão a relevância dos resultados (Kendall et al., 2008). Tornam-se assim necessários mais estudos *in vivo*, ou usando mitocôndrias intactas e/ou células vivas. Estas alterações podem acontecer em qualquer dos complexos proteicos, sendo os efeitos no complexo IV os mais severos porque neste complexo dá-se a redução de oxigénio a água. A inibição do complexo III pode resultar no aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS).

Os fármacos de interesse clínico, que interferem com a CRM, não têm sido muito estudados. No entanto, alguns exemplos conhecidos inibem o complexo I, como por exemplo: amiodarona, perhexilina, flutamida, antralina, papaverina, meperidina, cinarizina e haloperidol (Scatena, 2007). A inibição do complexo I resulta em efeitos tóxicos, como rabdomiólise e insuficiência hepática aguda.



**Figura 6** - Representação dos alvos moleculares da toxicidade molecular induzida por fármacos.

Abreviaturas: CPT – carnitina palmitoyl transferase, KDH – α-cetoglutarato desidrogenase, MDH – malato desidrogenase, TOM – transportador da membrana externa, TIM – transportador da membrana interna. [Adaptado de Kendall et al., 2008]

Os inibidores da oxidação de substratos da CRM mimetizam a estrutura do substrato natural e, portanto, funcionam como inibidores competitivos. A inibição desta via interfere com a formação e libertação de equivalentes reduzidos na CRM. Desta forma, os inibidores dos substratos de oxidação causam o mesmo déficit metabólico que os inibidores que actuam directamente na cadeia transportadora de electrões.

As interferências com o mtDNA podem ocorrer por oxidação (ex. álcool) ou inibição da síntese de mtDNA, como acontece com os análogos dos nucleósidos (Lewis et al., 1995).

Nos últimos anos, farmacologistas e toxicologistas têm apontado a mitocôndria como um importante alvo intracelular na manifestação de uma variedade de efeitos benéficos e adversos de fármacos.

A toxicidade mitocondrial induzida por fármacos utilizados como terapêutica ocorre com o uso de antidiabéticos orais, os antineoplásicos ou antirretrovirais. Os principais inibidores da biogénese mitocondrial são os antivirais análogos dos nucleósidos, desenhados para interferir com a transcrição reversa do RNA viral do invasor (Toogood et al., 2008).

Apesar de inúmeros fármacos interagirem com alvos mitocondriais de forma não específica e terem potencial para causar efeitos adversos, há um interesse crescente por fármacos que alteram a função mitocondrial de forma específica, nomeadamente nas áreas da obesidade, diabetes, doenças neurodegenerativas e cancro (Armstrong et al., 2007).

O estudo da “segurança mitocondrial” para novas moléculas que vão sendo descobertas é de interesse para as companhias farmacêuticas que podem agora seleccionar fármacos que não apresentem toxicidade mitocondrial.

### **1.4.1. Acção do propofol ao nível mitocondrial**

É um dado adquirido que a mitocôndria é um alvo farmacológico dos agentes anestésicos. Os efeitos podem ser tóxicos, como no caso da miotoxicidade induzida pelos anestésicos locais, ou benéficos, como os que têm sido observados no pré-condicionamento do miocárdio induzido por anestésicos gerais (Nouette-Gaulain et al., 2007).

Os anestésicos endovenosos podem interferir com o metabolismo dos hidratos de carbono, o consumo de oxigénio e a produção de energia no sistema nervoso. No entanto, a forma como alteram a função mitocondrial não está bem esclarecida.

Em 1995, Branca et al. verificaram que o propofol apenas alterava o metabolismo bioenergético em concentrações muito acima das utilizadas na prática clínica, em mitocôndrias isoladas de coração de rato, (Branca et al., 1995).

Foi demonstrado que o propofol diminui o consumo de oxigénio e a produção de ATP em sinaptossomas do cérebro (Marian et al., 1997)). Rigoulet verificou num estudo em mitocôndrias de ratos, que o propofol inibia o complexo I da CRM e podia interferir com a ATPase bem como afectar as proteínas desacopladoras, provocando uma disrupção entre o transporte de electrões e a síntese de ATP (Rigoulet et al., 1996).

A estrutura do propofol contém um grupo hidroxil fenólico, semelhante ao da vitamina E, um anti-oxidante natural e foi demonstrado *in vitro* e *in vivo* que a actividade anti-oxidante do propofol resulta da sua estrutura química fenólica (Ansley et al., 1998).

Em vários modelos experimentais para proteger a célula do stress oxidativo, verificou-se que o propofol inibia a peroxidação lipídica (Hans et al., 1997; Manataki et al., 2001; Stratford and Murphy, 1998).

A sobrevivência das células cerebrais e o *outcome* neurológico foram positivamente correlacionados com a dose de propofol, em modelos experimentais de AVC (Kochs et al., 1992; Yamasaki et al., 1999).

Marthy-Hartert et al. (2000) descreveram que o propofol reage com peroxinitrito levando à formação de um radical fenoxil derivado do propofol e colocaram a hipótese de que o propofol seria um *scavenger* do peroxinitrito.

Foi ainda demonstrado por Chang et al. (2001) que o propofol, em concentrações de aplicação clínica, pode inibir a mobilização do cálcio intracelular, diminuir o potencial de membrana e alterar a morfologia mitocondrial em células endoteliais da aorta bovinas. O mesmo grupo de investigadores (Chen et al., 2003) sugeriu que o propofol causava supressão da função macrofágica por um mecanismo que envolvia a inibição do potencial de membrana mitocondrial e a síntese de ATP.

Têm sido referidos, por diversos autores, efeitos inibitórios no metabolismo energético mitocondrial ao nível da fosforilação oxidativa (OXPHOS), mediados pelo propofol (Johnson et al., 2003; Acco et al., 2004). Em geral, a inibição observada tem sido associada a uma redução na produção de ATP. Atendendo a estes mecanismos, especula-se que a inibição da transferência de electrões na CRM, e a diminuição de disponibilidade energética nos tecidos neuronais, constituem uma hipótese para explicar o mecanismo de acção dos anestésicos.

Nem todos os efeitos referidos na literatura para a acção deste anestésico ao nível da CRM foram de carácter inibitório. Também foi descrito que propofol tem um efeito de desacoplador, que estimulava o consumo de oxigénio e inibia a gluconeogénese (Johnson et al., 2003).

Acquaviva et al. (2004) demonstraram que o propofol protegia as células astrogliais, de uma forma dependente da dose, contra a citotoxicidade mediada pelo peroxinitrito, lesão do DNA e apoptose. Estes efeitos são parcialmente mediados pela indução da via da heme-oxigenase.



Existem outros estudos que evidenciam que o sevoflurano e o propofol reduzem a extensão de necrose e melhoram a recuperação neurológica, em modelos de roedores submetidos a isquémia cerebral e reperfusão. Engelhard et al. (2004) investigaram a forma como o sevoflurano e o propofol afectavam a expressão das proteínas reguladoras da apoptose após isquémia cerebral em ratos. Concluíram que, além dos efeitos anti-necróticos destes dois anestésicos, havia também uma redução da concentração das proteínas Bax, indutoras de apoptose. No entanto, a contribuição precisa dos efeitos destes anestésicos na morte celular por apoptose no organismo humano continua ainda por clarificar.

Shao et al (2008) demonstraram que o propofol exerce protecção cardíaca dose-dependente, pela diminuição da produção de espécies reactivas (ROS) de oxigénio e prevenção da peroxidação da cardiolipina durante períodos de isquémia/reperfusão do miocárdio. Demonstraram também que o propofol administrado antes da isquémia e durante a reperfusão atenua as alterações mitocondriais.

Em geral, o propofol é considerado um anestésico seguro. No entanto, há relatos ocasionais de fenómenos excitatórios, pancreatite e toxicidade hepatocelular.

A sua utilização, por longos períodos de tempo, particularmente em doses elevadas está associada ao risco de Síndrome de Infusão do Propofol (SIP), uma reacção tóxica caracterizada por acidose metabólica, rabdomiólise, cardiomiopatia aguda e morte. Tem sido descrito em crianças internadas em Unidades de Cuidados Intensivos e está associado a perfusões de propofol superiores a 5 ml/Kg/h durante períodos superiores a 48 horas. Existem evidências experimentais que sugerem que a causa deste Síndrome está associada a alterações do metabolismo dos ácidos gordos livres devido à inibição da sua entrada na mitocôndria e também a variações específicas ao nível da cadeia respiratória mitocondrial (Short et al., 2003).

O SIP mimetiza uma miopatia mitocondrial em que há défices específicos na CRM associadas a alterações específicas do DNA mitocondrial. As características clínicas da miopatia mitocondrial resultam de alterações do metabolismo lipídico no músculo cardíaco e esquelético. Estes doentes, geralmente estão assintomáticos até à existência de determinados factores precipitantes, como infecção ou jejum. No entanto, anomalias bioquímicas subclínicas da CRM podem ser demonstradas. Tem sido sugerido que a maior incidência de SIP na criança está relacionada com uma alteração do metabolismo dos ácidos gordos, por défice de aporte calórico e aumento das necessidades metabólicas, em crianças susceptíveis (Wolf et al., 2001).

A raridade deste síndrome no adulto pode estar relacionada com o facto das reservas de hidratos de carbono serem superiores e as necessidades de propofol para sedação menores. É muito provável que o SIP ocorra apenas em indivíduos com predisposição genética para tal.

Cattano (2008) verificou que o propofol induz apoptose neuronal em cérebro de ratinhos. Mas, a relevância destes estudos animais em humanos não é conhecida.

Bains et al., (2009) compararam o efeito de doses equipotentes de sevoflurano e propofol na despolarização mitocondrial e concluíram que estes dois fármacos causam despolarização da mitocôndria em terminais nervosos, de ratos e humanos, e que o efeito despolarizante do propofol parece estar relacionado com a inibição dos complexos I e V da CRM.

## **1.8. Investigação Farmacogenómica em anestesia**

A variabilidade interindividual na resposta aos fármacos, quer em termos de eficácia, quer em termos de segurança, é uma constante na prática do anestesiológista. Sabe-se hoje que alguma desta variabilidade está relacionada com factores genéticos.

Há muitos anos que é reconhecida a importância dos factores genéticos nas diferentes respostas aos fármacos utilizados na anestesia (Kalow et al., 1957). Em 1964, Kalow descreveu uma série de condições raras, que pareciam seguir um padrão mendeliano de transmissão e que predispunha o indivíduo afectado a uma resposta idiossincrática a um fármaco ou grupo de fármacos usados durante a anestesia. Estas condições incluíam síndromes miotónicas, défice de pseudocolinesterases, porfirias e hipertermia maligna.

Os rápidos avanços da genética molecular permitiram identificar associações entre o perfil genético individual e a resposta aos fármacos. O termo farmacogenética é utilizado para descrever a forma como as alterações genéticas nos genes moduladores da acção dos fármacos estão relacionadas com a variabilidade na resposta interindividual à terapêutica ou ao aparecimento de efeitos secundários, ou mesmo tóxicos. Esta variabilidade na acção dos fármacos pode ser ao nível da farmacocinética ou da farmacodinâmica.

A variabilidade farmacocinética refere-se a diferenças na absorção, distribuição, metabolismo e excreção de fármacos. As moléculas envolvidas neste processo incluem enzimas metabolizadoras, como as do sistema citocromo P450 e ou das que participam nas vias de conjugação, moléculas transportadoras e alvos intracelulares.

A maioria das enzimas envolvidas no metabolismo dos anestésicos são polimórficas e estes polimorfismos estão relacionados com alterações na biodisponibilidade dos fármacos e também com o risco de aparecimento de efeitos adversos. O halotano é metabolizado pela citocromo P450 (CYP) E1 e em menor extensão pelas CYP3A4 e CYP2A6. A CYP2E1 tem também um papel fundamental no metabolismo do isoflurano, sevoflurano, enflurano e desflurano. As CYP2B6, CYP3A4 e CYP2C9 são relevantes no metabolismo da ketamina. As enzimas envolvidas no metabolismo do tiopental e etomidato continuam por definir. O propofol é metabolizado principalmente por glucuronidação pelas difosfato-glucuronosiltransferases e por hidroxilação pelas enzimas CYP2B6 e CYP2C.

A variabilidade farmacodinâmica refere-se aos diferentes efeitos dos fármacos, relativamente ao seu mecanismo de acção, incluindo variações mediadas pelos receptores que servem de intermediários neste processo, mesmo que as concentrações que chegam aos alvos de acção sejam semelhantes.

Este facto pode reflectir variabilidade na função dos alvos moleculares dos fármacos ou na fisiopatologia da interacção receptor-alvo (afinidade, alterações na expressão mediadas pela ligação). Portanto, a farmacogenómica investiga fenótipos de eficácia/toxicidade farmacológica, com o objectivo de identificar novos alvos terapêuticos e de possibilitar uma actuação terapêutica mais racional.

A potência dos anestésicos inalatórios, definida como concentração alveolar mínima (MAC) de um anestésico para impedir movimentos em resposta a um estímulo cirúrgico, varia de indivíduo para indivíduo, com um coeficiente de variação de 10% (Barash et al., 2009). Uma parte desta variabilidade poderá ser explicada por factores genéticos.

Diferentes factores genéticos foram associados a diferenças nas necessidades de anestésicos gerais em várias espécies animais, incluindo no rato (McCrae et al., 1993), nemátodes (*C. Elegans*) (Van Swinderen et al., 1998) e na mosca da fruta (*Drosophila Melanogaster*) (Madhavan et al., 2000). No entanto, ainda não foram estabelecidas associações semelhantes em seres humanos.

Os anestesistas mais experientes costumam referir que os ruivos têm necessidades anestésicas superiores às das pessoas com cabelo de outra cor. O fenótipo cabelo ruivo resulta de variações no gene que codifica o receptor da melanocortina (*MC1R*). Edwin et al. (2004) compararam as necessidades de desflurano entre mulheres ruivas e mulheres de cabelo escuro e verificaram que o consumo de desflurano era 19% superior nas mulheres ruivas. Verificaram também que a maioria das mulheres ruivas (9 em 10) eram portadoras de um polimorfismo no gene *MC1R*.

Têm sido criadas inúmeras estirpes de ratinhos *knock-out* para investigar funções específicas de determinados genes e mecanismos de acção de fármacos. Um exemplo é o estudo da sensibilidade aos anestésicos gerais em animais sem a subunidade  $\beta 3$  (Wong et al., 2001) ou  $\alpha 6$  do receptor GABA-A (Homanics et al., 1997). Esta abordagem tem dado contributos importantes relativamente aos mecanismos de acção das benzodiazepinas e dos anestésicos endovenosos (Rudolph et al., 1999). Num outro estudo, em ratinhos, Jurd et al. (2003) mostraram que a introdução de uma mutação pontual (N265M) na subunidade 3 do receptor GABA-A, provocava uma redução dramática na sensibilidade aos anestésicos endovenosos etomidato e propofol. Estes autores provaram que o resíduo N265, localizado no domínio transmembranar da subunidade  $\beta 3$ , tem um papel chave na mediação de hipnose e imobilização por propofol e etomidato.

Os estudos realizados relativamente à genotoxicidade do propofol, em que se analisou um marcador de lesão cromossómica, concluíram que o propofol não é genotóxico (Tomioka et al., 2000; Thorsten et al, 2003). Mas, descrição da

avaliação do efeito do propofol no número de cópias de mtDNA não foi encontrada na literatura até à data.

A investigação para os anestésicos inalatórios é muito mais complexa, uma vez que os seus efeitos parecem ser mediados por diferentes receptores.

## **1.9. Modelos *in vitro* na investigação translacional**

De entre os vários modelos celulares e animais disponíveis para estudos de toxicidade e/ou mecanismos de acção de fármacos, as células *HeLa* em cultura têm sido utilizadas com muita frequência, durante as últimas décadas, como modelo celular em diversas áreas de investigação. A linha celular *Hela*, como ficou conhecida, foi criada pela primeira vez em 1952 por Gey (Gey et al., 1952), foi desenvolvida a partir de células humanas de carcinoma cervical humano, dividindo-se continuamente (Gey et al., 1954).

As células *HeLa* podem ser mantidas num meio de cultura contendo soro bovino fetal, oferecendo uma ferramenta útil para estudos de toxicidade e mecanismos envolvidos, em particular envolvendo o sistema energético mitocondrial (Benard et al., 2007).

## **2. Material e métodos**



O presente trabalho refere-se a um estudo laboratorial realizado em células *HeLa*, para testar os efeitos do propofol. A escolha deste fármaco deve-se ao facto de, por um lado, ser o mais utilizado, tal como foi anteriormente referido, por outro, porque é dos mais bem caracterizados, o que permite uma avaliação mais rigorosa dos resultados obtidos.

Para cada uma das condições experimentais foram realizadas cerca de 5 medições independentes, em réplicas de 3, dando um total de 30 avaliações para cada um dos ensaios a realizar, de modo a permitir a análise estatística adequada.

## **2.1. Cultura das Células HeLa**

Procedeu-se à cultura de células *HeLa* no meio de cultura DMEM, contendo soro fetal vitelino e estreptomicina/penicilina 1/100, a 37°C, com 95% de CO<sub>2</sub>/5% O<sub>2</sub>. A mudança de meio efectuou-se em intervalos de 2 dias. Quando as células atingiram uma confluência de 90%, o meio foi retirado e realizou-se a tripsinização (Trypsina-EDTA, 30 minutos a 37°C), de forma a libertar as células para serem analisadas.

### **2.1.1. Exposição das Células aos Anestésicos**

Foi realizada uma pesquisa de modo a estabelecer a concentração fisiológica plasmática de anestésico num indivíduo sujeito a anestesia, usando essa concentração como base para realizar uma curva dose-resposta para determinar as concentrações de teste para as experiências a realizar.

As células foram expostas ao propofol em diferentes concentrações (4 µg/ml, 20µg/ml, 100µg/ml e 300µg/ml) durante 15 minutos e 1 hora. Um grupo de células foi exposto a *Intralipid*, o excipiente do propofol. As células não tratadas serviram de controlo da experiência.

## **2.2. Avaliação da viabilidade celular**

A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão do azul de tripano (corante que só permeabiliza células com danos membranares) e pela medição da percentagem de lactato desidrogenase (LDH) libertada (Koh et al., 1987), tendo em conta que é uma enzima citoplasmática.

## **2.3. Avaliação espectrofotométrica da actividade dos complexos da CRM**

Foi utilizada a técnica de espectrofotometria de absorção para medir a actividade enzimática dos complexos da CRM.

A actividade enzimática dos diferentes complexos da CRM é medida através da absorção selectiva de radiação a determinado comprimento de onda ( $\lambda$ ), por diversos compostos específicos em solução na cuvette.

Todas as medidas serão adquiridas no espectrofotómetro em duplo comprimento de onda (SLM Aminco 2000), medindo a variação da diferença de absorvância dos 2 comprimentos de onda, ao longo do tempo, a 37° C. O protocolo foi seguido de acordo com Rustin et al (1994), com algumas modificações (Grazina, 2004).

A actividade do complexo I sensível à rotenona foi obtida através da medição da redução ou oxidação do citodromo C dependente de NADH, na presença da decilubiquinona.

A actividade do complexo II foi obtida medindo a taxa de redução do diclorofenol indofenol dependente do succinato, na presença da decilubiquinona. Utilizando metossulfato de fenazina em vez da ubiquinona,

podemos obter uma estimativa da actividade da succinato desidrogenase em condições semelhantes.

A actividade do complexo III foi estimada pela oxidação de decilubiquinol sensível a antimicina A.

A actividade do complexo IV foi avaliada pela medida da redução do citocromo C num meio iso-osmótico, permitindo que as membranas mitocondriais se mantivessem intactas.

Finalmente, a actividade da ATPase (Complexo V) foi medida em presença de desidrogenase láctica e piruvato cinase, de modo a detectar a síntese de ATP mediada por aquele complexo.

A Citrato Sintetase é responsável pela reacção de condensação da acetil-CoA com o oxaloacetato, que ocorre na matriz mitocondrial e é a primeira reacção do ciclo de Krebs. A actividade da CS foi estimada com uma escala de absorvância de 0 a 1, em 1 ml de meio S, pela reacção de condensação de Ac-CoA 0.2 mM com OAA 8mM.

## **2.4. Determinação da concentração proteica**

O teor proteico das amostras foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Este método baseia-se na alteração de cor de um corante (Brilliant Blue G) em resposta às diferentes concentrações de proteína.

## 2.6. Análise de número de cópias do mtDNA

O DNA foi obtido de células HeLa de acordo com os métodos padronizados e a concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria a 260 nm (Grazina, 2004).

O número de cópias de mtDNA e do nDNA foram determinados por PCR em tempo-real com *SYBR* usando primers específicos para o gene mitocondrial tRNA<sup>Leu</sup>(uur) e para o gene nuclear  $\beta$ -2-microglobulina ( $\beta$ 2M) (Bai e Wong, 2005). A intensidade dos sinais de fluorescência foi analisada utilizando o software SDS v2.2.2 (Applied biosystems, Foster City, CA). O conteúdo relativo de mtDNA, tanto das condições estudadas como dos controlos, foi calculado através do  $\Delta$ Ct, que é a diferença entre o valor de Ct do gene  $\beta$ 2M e o valor de Ct do gene tRNA<sup>Leu</sup>(uur), em que *Ct* = *cycle threshold*.

## 2.7. Avaliação da morte celular por apoptose

A análise das características apoptóticas por imunocitoquímica faz-se utilizando microscópica fluorescente/confocal (fragmentação nuclear, localização do citocromo C, externalização da fosfatidilserina com anexina V); análise espectrofotométrica/ELISA (ativação da caspases) e determinação por *western blotting* (clivagem de PARP e libertação de citocromo C) (Rodrigues et al. 1999; Cardoso et al 2004). O ácido deosoxicólico (DCA) usa-se como controlo positivo.

## 2.8. Análise Estatística

A caracterização de cada uma das variáveis, em cada combinação de instante de tempo e concentração, foi realizada determinando o número de réplicas, a média amostral, o desvio padrão e os valores mínimo e máximo observados.

Com o objectivo de estudar simultaneamente o efeito dos dois factores fixos, tempo de exposição e concentração de propofol, realizou-se uma análise de variância dupla do tipo III em que o tempo de exposição apresenta dois níveis, 15 e 60 minutos e a concentração apresenta cinco níveis 0, 4, 20, 100 e 300 µg/ml. Para esta análise utilizaram-se três testes F de forma a investigar cada uma das três hipóteses seguintes: existência de diferença entre os níveis do tempo de exposição; existência de diferença entre os níveis da concentração de propofol e finalmente existência de interacção dos dois factores, isto é, se as diferenças entre os níveis da concentração estão dependentes do tempo de exposição e se as diferenças entre os tempos dependem da concentração usada. Sempre que não se verificou interacção, os efeitos da concentração e do tempo foram estudados de forma independente por meio da construção de dois polinómios. Quando se verificou interacção e efeito significativo do tempo e da concentração, construiu-se uma superfície de resposta. Os pressupostos desta análise foram analisados, sendo cumpridos em todas as análises efectuadas.

Foram realizadas comparações múltiplas recorrendo ao teste de *Tukey*. As comparações entre cada uma das concentrações e o controlo foram feitas utilizando o teste de *Dunnett*. Nas variáveis em que se verificou interacção dos dois factores, este teste foi realizado em separado para as observações aos 15 e aos 60 minutos. Para uma melhor visualização, as médias e respectivos intervalos de confiança foram representados em gráficos. O software utilizado foi o *STATISTICA v7.1*. e as diferenças observadas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### **3. Resultados**

### 3.1 Influência do propofol na libertação de LDH

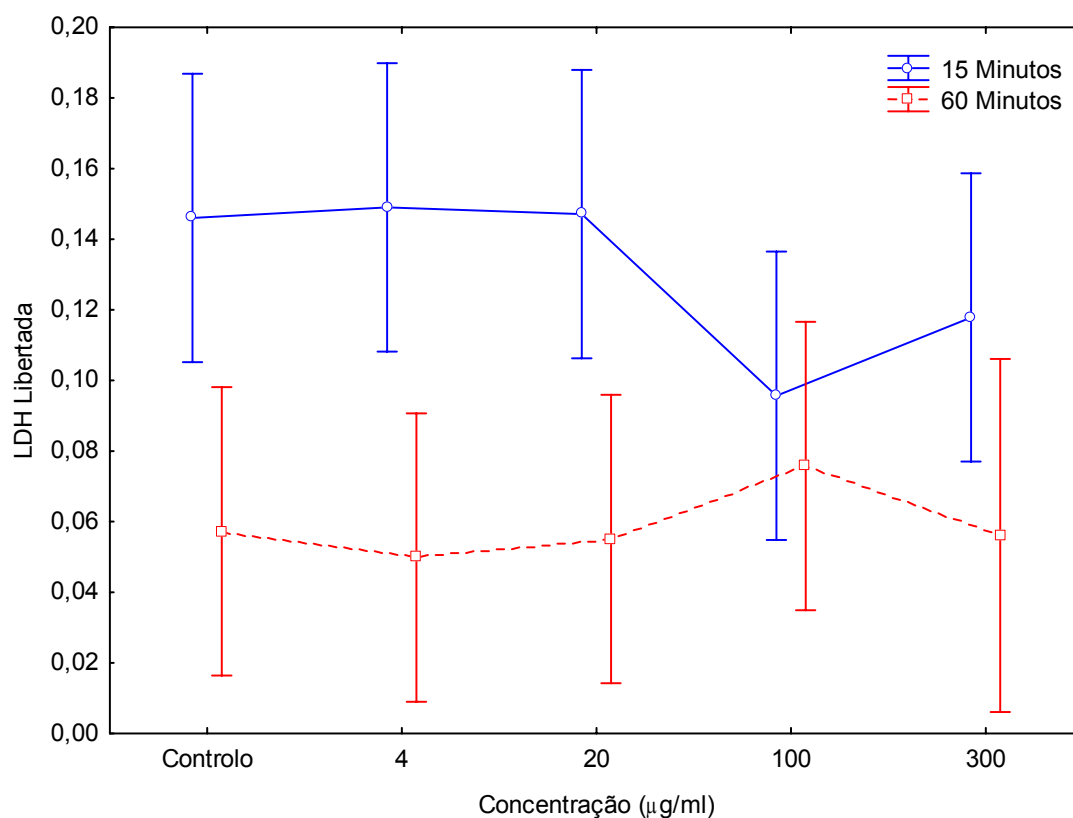
Os resultados da avaliação da actividade da LDH, em resposta à incubação com diferentes concentrações de propofol, nos dois tempos de observação são apresentados na tabela 1.

**Tabela 1** - Resultados da avaliação da actividade da LHD, em resposta à incubação com diferentes concentrações de propofol, em dois tempos de exposição.

LDH Libertada			Concentração				
			0 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	300 $\mu\text{g/ml}$
Tempo de Observação	15 Minutos	Média± DP Min-Máx	N=3 0,1460 ± 0,0282 0,1202 - 0,1761	N=3 0,1490 ± 0,0662 0,0854 - 0,2176	N=3 0,1471 ± 0,0164 0,1340 - 0,1655	N=3 0,0956 ± 0,0485 0,0470 - 0,1439	N=3 0,1178 ± 0,0106 0,1067 - 0,1279
	60 Minutos	Média± DP Min-Máx	N=3 0,0573 ± 0,0307 0,0220 - 0,0778	N=3 0,0498 ± 0,0380 0,0118 - 0,0877	N=3 0,0551 ± 0,0153 0,0374 - 0,0648	N=3 0,0757 ± 0,0150 0,0661 - 0,0931	N=2 0,0561 ± 0,0139 0,0463 - 0,0659

Observou-se que para o tempo de exposição de 15 minutos, a LDH Libertada sofre oscilações muito ténues desde o controlo até à concentração 20  $\mu\text{g/ml}$  observando-se uma diminuição na concentração 100  $\mu\text{g/ml}$ , a que se segue uma subida ligeira na concentração 300  $\mu\text{g/ml}$  (figura 7).

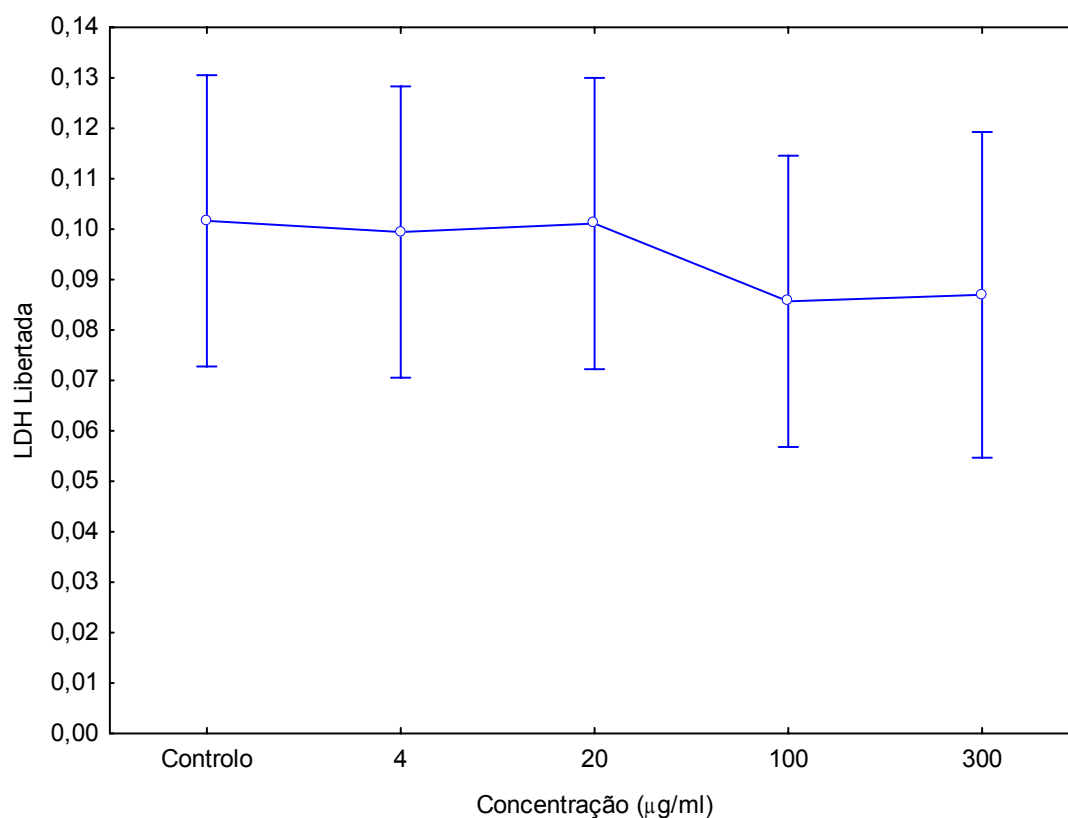
Também para o tempo de exposição de 60 minutos, a LDH libertada apresenta oscilações ténues ao longo de todas as concentrações. Tanto aos 15 como aos 60 minutos a LDH libertada não parece apresentar grande influência da concentração de propofol. Quando comparamos os valores da LDH libertada nos dois instantes de tempo, notamos que o comportamento não é homogéneo em todas as concentrações. Os valores são bastante distintos nas concentrações 0, 4 e 20  $\mu\text{g/ml}$ . No entanto, para as concentrações 100 e 300  $\mu\text{g/ml}$  não parece haver uma distinção entre os dois tempos.



**Figura 7** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança para a LDH Libertada, em cada tempo de observação, segundo as cinco concentrações de Propofol.

A análise factorial para os dados relativos à LDH libertada revelou que a interacção entre os dois factores fixos, tempos de exposição e concentração de propofol não é significativa,  $p=0,277$ . Assim, os efeitos da concentração e do tempo de exposição são analisados em separado. O efeito da concentração não é significativo,  $p=0,866$  e o efeito do tempo de exposição é significativo,  $p<0,001$ . As figuras 8 e 10 apresentam os valores da LDH libertada em separado para a concentração e para o tempo de exposição.

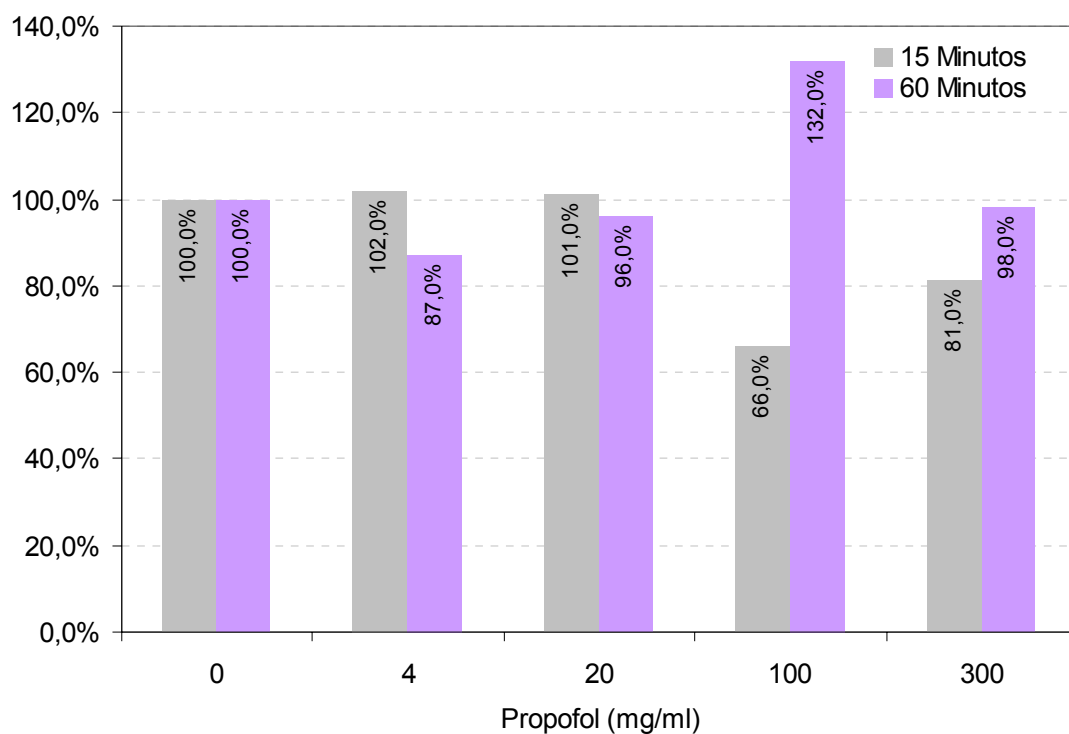




**Figura 8** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança para a LDH Libertada, em cada concentração de Propofol.

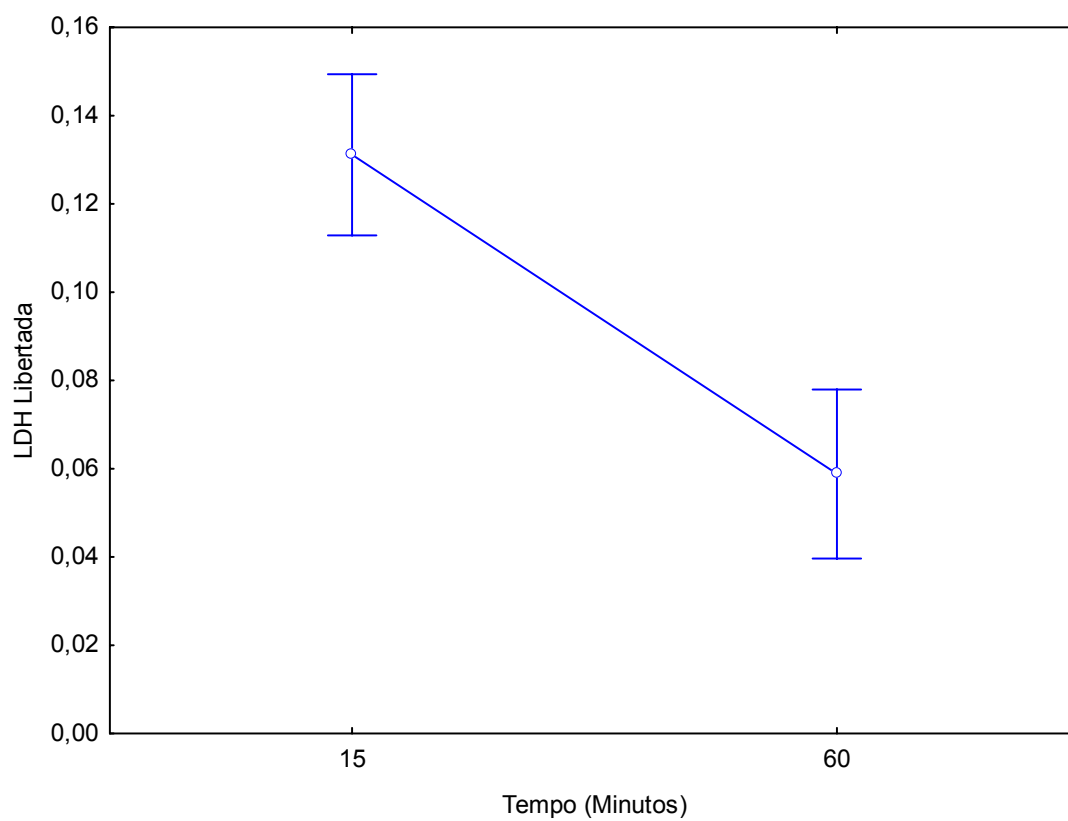
A partir da figura 8 é possível confirmar que os valores de LDH libertada se mantêm constantes ao longo das diferentes concentrações.

Como a concentração de Propofol não tem efeito na LDH Libertada, podemos concluir que as concentrações de 4, 20, 100 e 300 µg/ml de Propofol não diferem do controlo, 0 µg/ml. Na figura 9 apresentamos a percentagem de LDH para cada uma das concentrações em relação ao controlo.



**Figura 9** – Representação da percentagem de LDH para cada uma das concentrações em relação ao controlo

O tempo de exposição influencia a libertação de LDH verificando-se uma diminuição da libertação de LDH dos 15 para os 60 minutos (figura 10). Quanto mais prolongada for a exposição, menor é a libertação de LDH ( $p < 0,001$ ).



**Figura 10** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança para a LDH Libertada, em cada concentração de Propofol.

Foi testado também, o efeito do solvente do propofol, o intralipid e não se verificaram alterações estatisticamente significativas em relação ao controlo.

## 3.2. Influência do propofol na OXPHOS

### 3.2.1 Actividades dos Complexos da CRM em valor absoluto

Na tabela 2 estão representadas todas as actividades relativas à avaliação da actividade dos complexos da CRM em resposta à incubação com diferentes concentrações de propofol, em dois tempos de exposição, 15 e 60 minutos.

**Tabela 2** - Resultados da avaliação da actividade dos complexos da CRM, em resposta à incubação com diferentes concentrações de propofol, em dois tempos de exposição.

<b>Tempo de Exposição</b>		<b>Concentração</b>				
		<b>0 µg/ml</b>	<b>4 µg/ml</b>	<b>20 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>300 µg/ml</b>
<b>Complexo I</b>						
<b>15 Minutos</b>	Média± DP	N=7 14,59 ± 3,39	N=5 13,98 ± 4,62	N=5 16,29 ± 5,41	N=5 28,16 ± 4,54	N=5 13,46 ± 5,16
	Mín-Máx	9,19 - 17,87	7,89 - 20,64	8,53 - 21,52	20,24 - 31,19	7,47 - 19,21
<b>60 Minutos</b>	Média± DP	N=7 14,59 ± 3,39	N=5 9,68 ± 5,38	N=5 26,71 ± 14,60	N=5 21,34 ± 4,87	N=5 10,00 ± 4,06
	Mín-Máx	9,19 - 17,87	3,76 - 17,77	12,87 - 43,67	17,70 - 29,85	5,79 - 16,42
<b>Complexo II</b>						
<b>15 Minutos</b>	Média± DP	N=7 15,14 ± 3,00	N=5 17,80 ± 4,99	N=5 18,83 ± 2,41	N=5 17,84 ± 3,39	N=5 14,71 ± 2,24
	Mín-Máx	10,66 - 18,94	10,33 - 22,41	16,05 - 21,89	13,72 - 23,01	12,38 - 17,27
<b>60 Minutos</b>	Média± DP	N=7 15,14 ± 3,00	N=6 11,28 ± 2,48	N=5 15,45 ± 2,82	N=5 17,32 ± 2,92	N=5 13,38 ± 2,99
	Mín-Máx	10,66 - 18,94	8,95 - 14,47	12,47 - 19,96	14,28 - 21,55	10,03 - 17,66
<b>Complexo III</b>						
<b>15 Minutos</b>	Média± DP	N=7 57,04 ± 32,49	N=5 43,41 ± 10,20	N=5 61,58 ± 23,36	N=5 155,46 ± 74,34	N=5 46,97 ± 9,84
	Mín-Máx	32,71 - 104,97	31,35 - 52,84	32,98 - 87,21	92,57 - 278,85	37,38 - 63,27
<b>60 Minutos</b>	Média± DP	N=7 57,04 ± 32,49	N=6 39,08 ± 22,99	N=5 172,63 ± 35,66	N=5 199,38 ± 46,98	N=5 54,73 ± 24,00
	Mín-Máx	32,71 - 104,97	15,64 - 70,18	125,65 - 214,47	163,12 - 268,75	31,77 - 92,45
<b>Complexo IV</b>						
<b>15 Minutos</b>	Média± DP	N=7 66,46 ± 10,77	N=5 58,67 ± 8,23	N=5 60,66 ± 5,38	N=5 69,36 ± 16,47	N=5 62,19 ± 3,35
	Mín-Máx	50,43 - 83,19	47,69 - 69,78	54,47 - 66,78	54,12 - 93,57	57,73 - 67,15
<b>60 Minutos</b>	Média± DP	N=7 66,46 ± 10,77	N=6 56,01 ± 15,91	N=5 68,49 ± 7,83	N=5 81,88 ± 26,49	N=5 54,72 ± 13,05
	Mín-Máx	50,43 - 83,19	43,23 - 85,72	60,37 - 81,10	48,14 - 111,13	42,44 - 70,67
<b>Complexo V</b>						
<b>15 Minutos</b>	Média± DP	N=6 22,47 ± 12,81	N=5 28,61 ± 15,63	N=5 22,62 ± 9,02	N=5 69,61 ± 16,70	N=5 10,31 ± 4,68
	Mín-Máx	9,88 - 41,59	14,39 - 51,20	16,57 - 38,39	44,43 - 90,13	3,90 - 16,70
<b>60 Minutos</b>	Média± DP	N=6 22,47 ± 12,81	N=5 12,78 ± 8,24	N=5 65,39 ± 32,04	N=5 67,79 ± 18,25	N=5 10,48 ± 5,41
	Mín-Máx	9,88 - 41,59	4,70 - 22,13	32,19 - 107,08	39,54 - 81,49	4,39 - 16,42

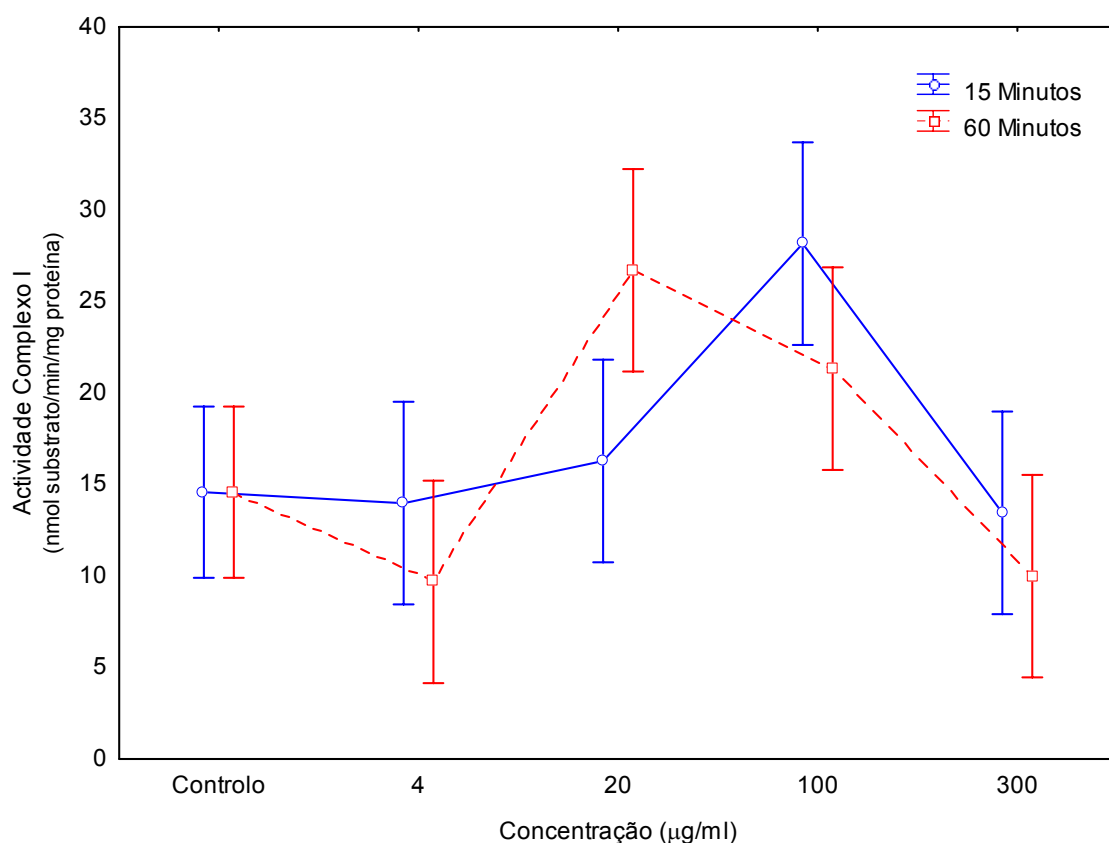
Legenda: N= número de experiências; DP= desvio padrão; Mín.= valor mínimo; Máx.= valor máximo

## Complexo I

Relativamente ao complexo I (figura 11), observou-se que para o tempo de exposição de 15 minutos, o complexo I mantém-se quase constante nas concentrações 4 e 20  $\mu\text{g/ml}$ , comparativamente com o controlo (0 $\mu\text{g/ml}$ ), observando-se uma subida acentuada na concentração 100 $\mu\text{g/ml}$ , seguida de uma descida também pronunciada para os 300  $\mu\text{g/ml}$ . Já para o tempo de exposição de 60 minutos, a actividade do complexo I começa por diminuir ligeiramente para a concentração 4  $\mu\text{g/ml}$ , aumentando marcadamente na concentração 20  $\mu\text{g/ml}$ . É atingido um valor máximo do complexo I aos 15 minutos na concentração 100  $\mu\text{g/ml}$ , enquanto o valor máximo aos 60 minutos é atingido aos 20  $\mu\text{g/ml}$ .

Quando comparamos os valores do complexo I nos dois instantes de tempo, notamos que o comportamento não é homogéneo em todas as concentrações. Os valores parecem idênticos nos dois tempos para as concentrações 4 e 300  $\mu\text{g/ml}$ . No entanto, para a concentração 20  $\mu\text{g/ml}$  o complexo I assume valores mais elevados aos 60 minutos, enquanto que na concentração 100  $\mu\text{g/ml}$  os valores mais elevados são observados aos 15 minutos.

A análise factorial para os dados relativos à actividade do Complexo I revelou que a interacção entre os dois factores fixos, tempos de exposição e concentração de propofol é significativa,  $p=0,027$ . Assim, o efeito da concentração tem de ser estudado em separado para cada tempo de exposição e o efeito do tempo tem de ser estudado em separado para cada concentração.



**Figura 11** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança do complexo I, em cada concentração de propofol, nos dois tempos de exposição.

A partir das comparações múltiplas é possível verificar que aos 15 minutos de exposição, a concentração 100 µg/ml difere de todas as outras, excepto da concentração 20 µg/ml ( $p=0,015$  para controlo,  $p=0,022$  para 4 µg/ml,  $p=0,096$  para 20 µg/ml e  $p=0,015$  para 300 µg/ml). Todas as outras concentrações não causam alterações na actividade.

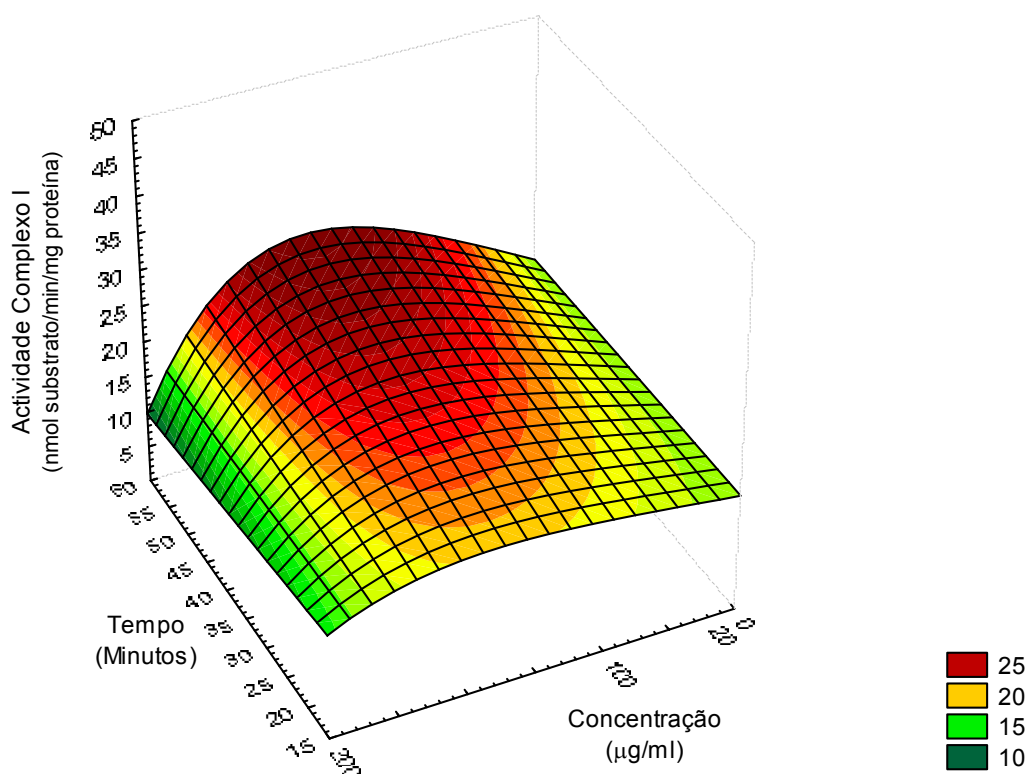
Aos 60 minutos de exposição, a concentração 20 µg/ml difere das restantes, excepto em relação à concentração 100 µg/ml ( $p=0,045$  para controlo,  $p=0,003$  para 4 µg/ml,  $p=0,926$  para 100 µg/ml e  $p=0,003$  para 300 µg/ml). Não existem alterações significativas relativamente às outras concentrações.

Em cada concentração realizaram-se as comparações entre os dois tempos de exposição. Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois

tempos de exposição em todas as concentrações,  $p=1,000$  no controlo,  $p=0,981$  para  $4 \mu\text{g/ml}$ ,  $p=0,212$  para  $20 \mu\text{g/ml}$ ,  $p=0,757$  para  $100 \mu\text{g/ml}$  e  $p=0,996$  para  $300 \mu\text{g/ml}$ .

Comparando cada uma das concentrações ( $4$ ,  $20$ ,  $100$  e  $300 \mu\text{g/ml}$ ) com o controlo, verifica-se que aos 15 minutos de exposição, apenas existe diferença para  $100 \mu\text{g/ml}$ , com  $p=0,004$  e  $p=1,000$  para as restantes. Aos 60 minutos de exposição o controlo apenas difere da concentração  $20 \mu\text{g/ml}$ ,  $p=0,012$  ( $p=0,713$  para  $4 \mu\text{g/ml}$ ;  $p=0,359$  para  $100 \mu\text{g/ml}$ ;  $p=0,774$  para  $300 \mu\text{g/ml}$ ).

Como a interacção entre os dois factores fixos, tempo de exposição e concentração de propofol é significativa, é possível representar geometricamente a relação existente entre estes dois factores e a actividade do Complexo I através de uma superfície de resposta a três dimensões (figura 12). A partir desta superfície, dando um valor para o tempo de exposição, em minutos, e um valor para a concentração em  $\mu\text{g/ml}$ , é possível estimar o comportamento da actividade do Complexo I em exposição ao fármaco propofol.



**Figura 12** - Representação gráfica tridimensional da superfície de resposta para Complexo I em função da concentração de propofol e do tempo de exposição.

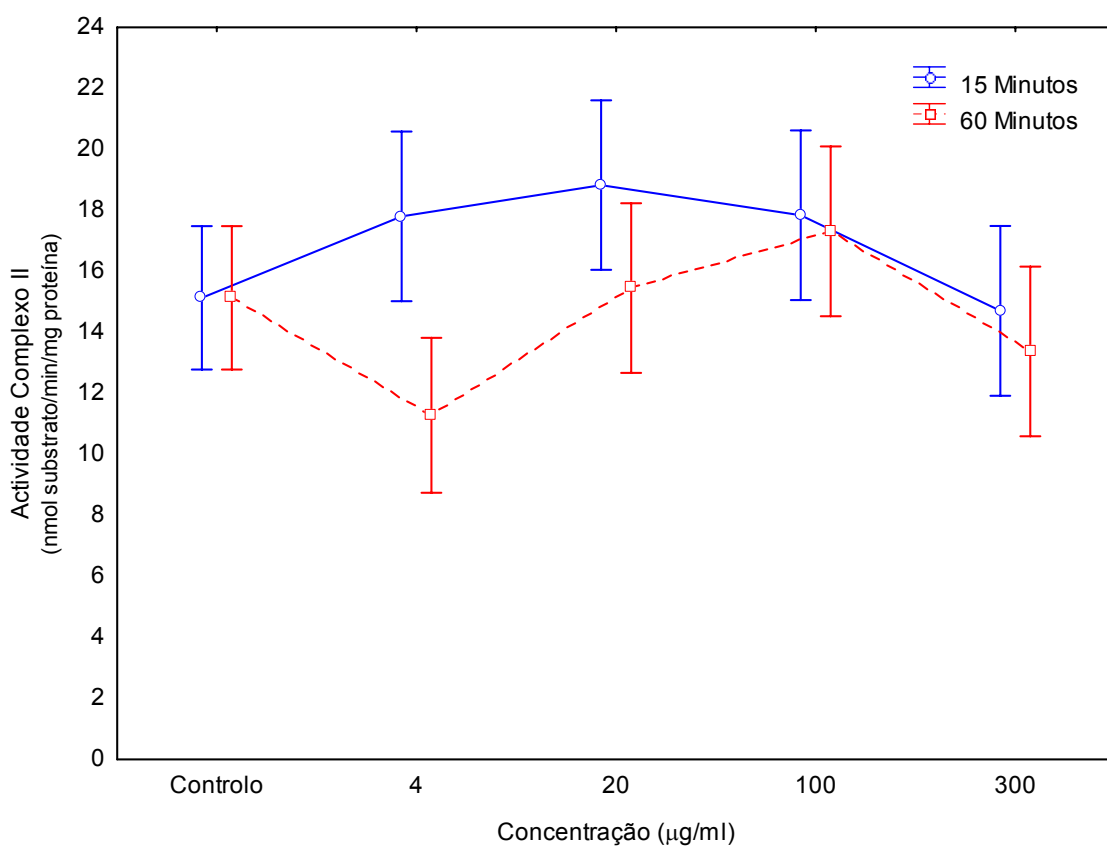
Os valores mais elevados do Complexo I são observados quando o tempo de observação é de 60 minutos e as concentrações de propofol estão entre 100 e 200  $\mu\text{g/ml}$ . Os valores mais baixos são observados para a concentração de 300  $\mu\text{g/ml}$  aos 60 minutos de observação.



## Complexo II

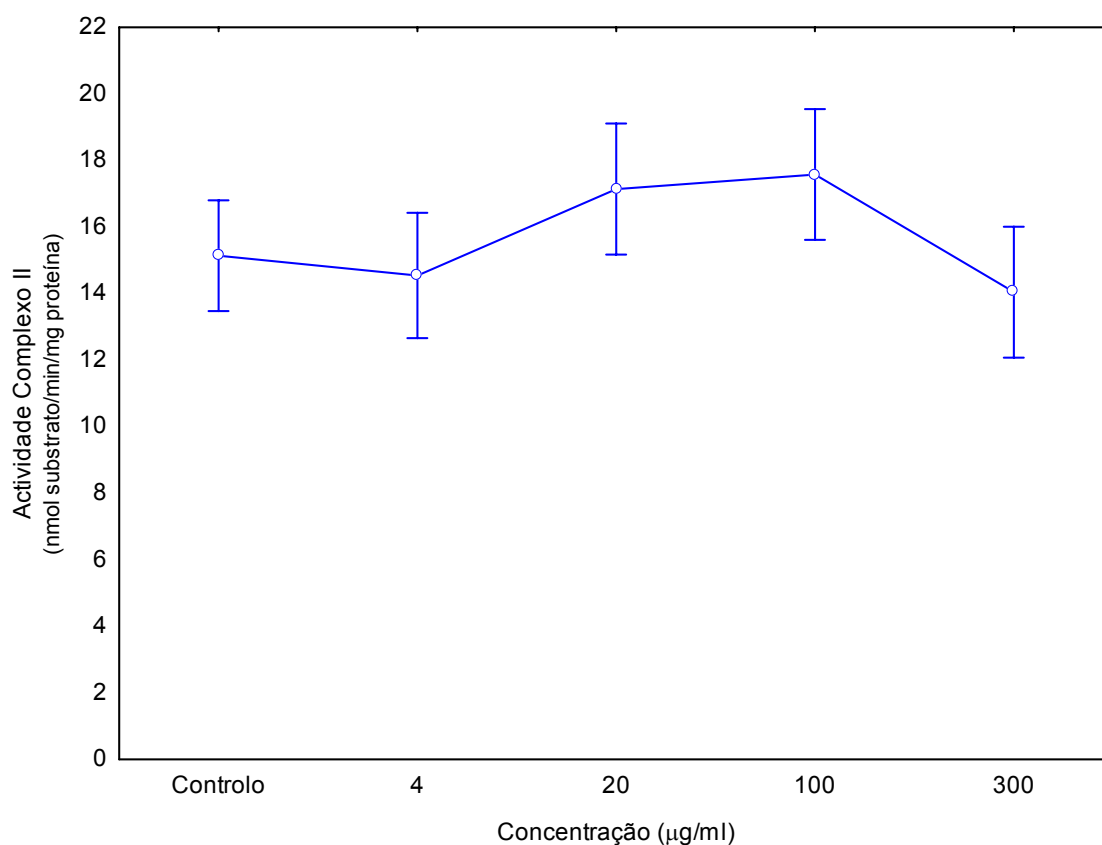
Relativamente ao complexo II (figura 13), observou-se que para o tempo de exposição de 15 minutos, o complexo II mantém-se quase constante em todas as concentrações. Já para o tempo de exposição de 60 minutos, o complexo II começa por diminuir ligeiramente entre o controlo e a concentração 4  $\mu\text{g/ml}$ , aumentando progressivamente até à concentração 100  $\mu\text{g/ml}$  e seguindo-se uma diminuição na concentração 300  $\mu\text{g/ml}$ .

Quando comparamos os valores do complexo II nos dois instantes de tempo, notamos que o comportamento é idêntico nas concentrações 0, 100 e 300  $\mu\text{g/ml}$ . Nas concentrações 4 e 20  $\mu\text{g/ml}$  surgem as diferenças mais acentuadas.



**Figura 13** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança do complexo II (SQDR), em cada concentração de propofol, nos dois tempos de exposição.

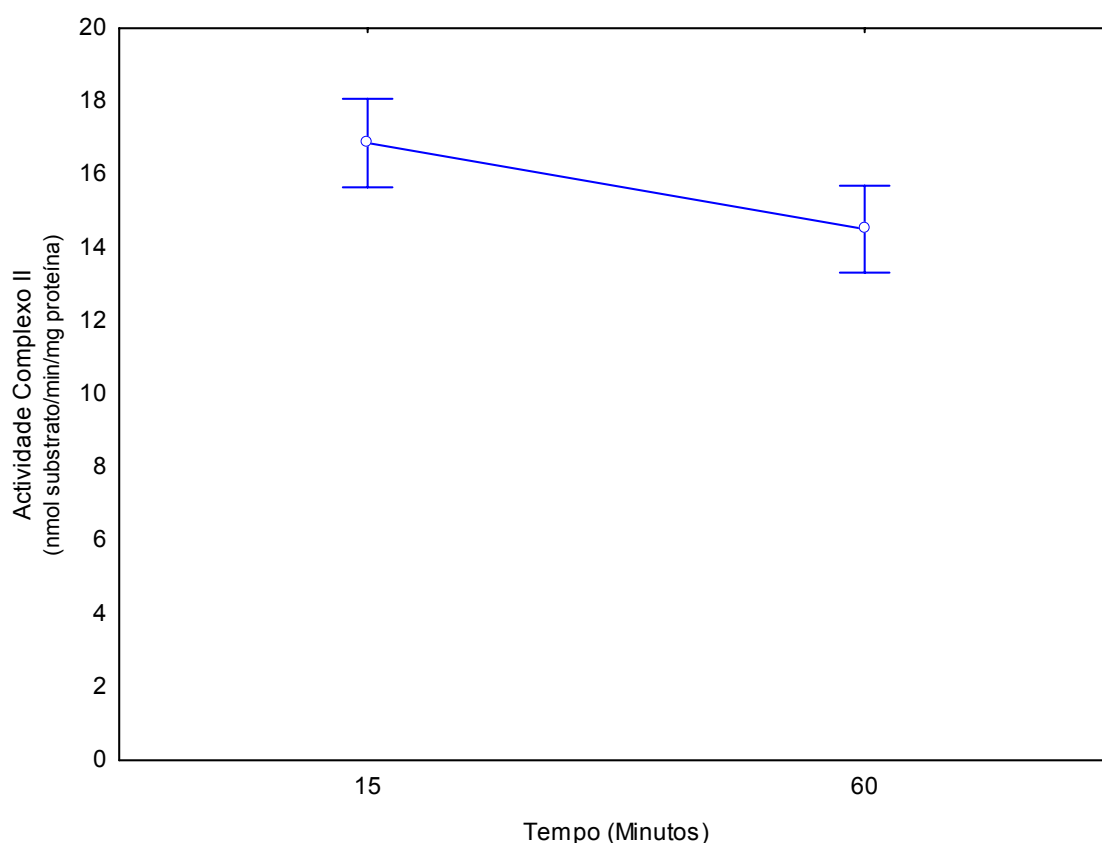
A análise factorial para os dados relativos à actividade do Complexo II revelou que a interacção entre os dois factores fixos, tempos de exposição e concentração de propofol não é significativa,  $p=0,096$ . Assim, os efeitos da concentração e do tempo de exposição são analisados em separado. O efeito da concentração no Complexo II é significativo,  $p=0,043$  e o efeito do tempo de exposição também é significativo,  $p=0,008$ . As figuras 14 e 15 apresentam os valores do Complexo II em separado para a concentração e para o tempo de exposição.



**Figura 14** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança da actividade do complexo II, em cada concentração de propofol.

Recorreu-se às comparações múltiplas para saber quais as concentrações que diferem entre si. No entanto, dado que foi necessário ajustar o nível de

significância por estarmos a realizar varias comparações, o teste não conseguiu encontrar quais as concentrações que diferem, dado que o valor p obtido na análise global estava muito próximo de 0,050.



**Figura 15** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança da actividade do complexo II, em cada tempo de exposição.

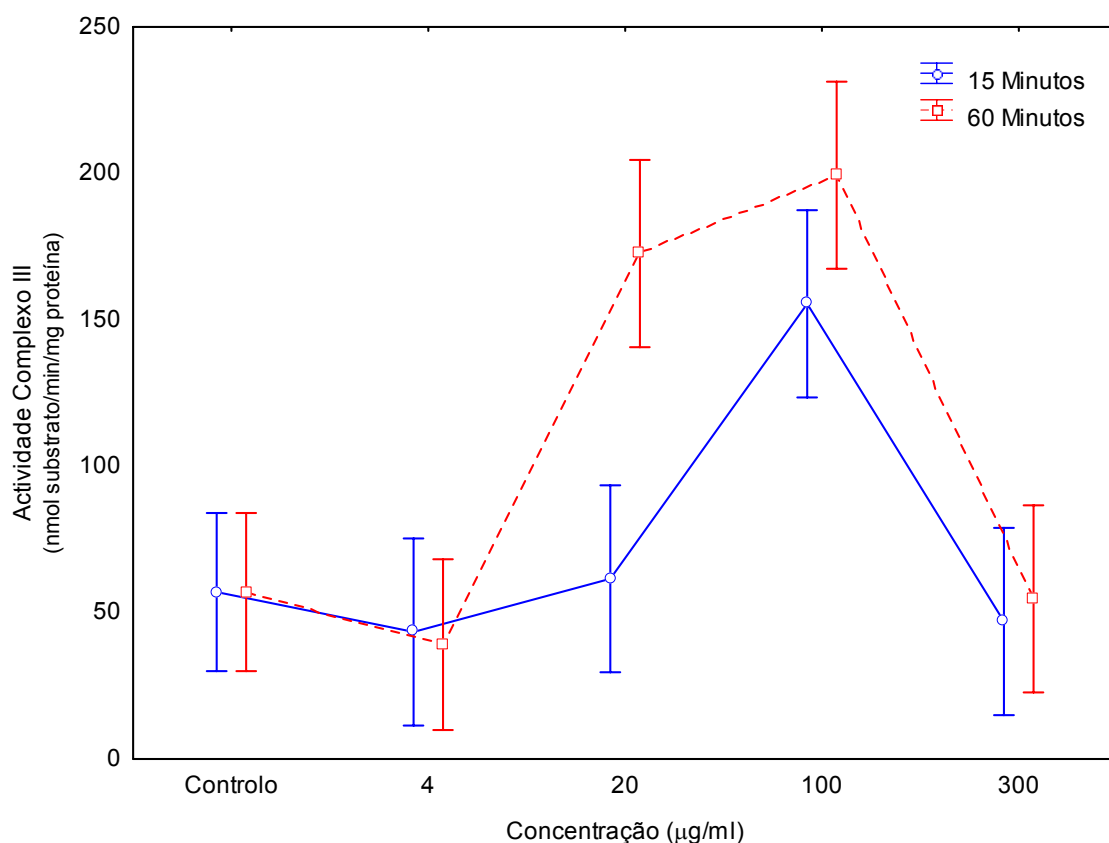
Verifica-se que os valores do complexo II diminuem à medida que aumentamos o tempo de exposição.

Da comparação do controlo com as concentrações 4, 20, 100 e 300  $\mu\text{g/ml}$ , não se verificaram diferenças significativas,  $p=0,896$ ,  $p=0,358$ ,  $p=0,197$  e  $p=0,824$  respectivamente.

## Complexo III

Relativamente ao complexo III (figura 16), observou-se que para o tempo de exposição de 15 minutos, a actividade mantém-se quase constante nas concentrações 0, 4 e 20  $\mu\text{g/ml}$  seguida de uma subida pronunciada para os 300  $\mu\text{g/ml}$ . Já para o tempo de exposição de 60 minutos, a actividade do complexo III aumenta marcadamente na concentração 20  $\mu\text{g/ml}$  com uma subida ligeira para a concentração 100  $\mu\text{g/ml}$  e uma diminuição abrupta para 300  $\mu\text{g/ml}$ . É atingido um valor máximo de actividade aos 15 minutos na concentração 100  $\mu\text{g/ml}$ , enquanto o valor máximo aos 60 minutos também é atingido aos 100  $\mu\text{g/ml}$ , estando muito próxima da concentração 20  $\mu\text{g/ml}$ .

Quando comparamos os valores do complexo III nos dois instantes de tempo, notamos que o comportamento não é homogéneo em todas as concentrações. Os valores parecem idênticos nos dois tempos para as concentrações 0, 4 e 300  $\mu\text{g/ml}$ . Na concentração 100  $\mu\text{g/ml}$  a diferença observada não é muito acentuada, no entanto, para 20  $\mu\text{g/ml}$  o complexo III assume valores marcadamente mais elevados aos 60 minutos em relação aos observados aos 15 minutos.



**Figura 16** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança actividade do complexo III, em cada concentração de propofol, segundo os dois tempos de observação.

A análise factorial para os dados relativos à actividade do Complexo III revelou que a interacção entre os dois factores fixos, tempos de exposição e concentração de propofol é significativa,  $p=0,002$ . Assim, o efeito da concentração tem de ser estudado em separado para cada tempo de exposição e o efeito do tempo tem de ser estudado em separado para cada concentração.

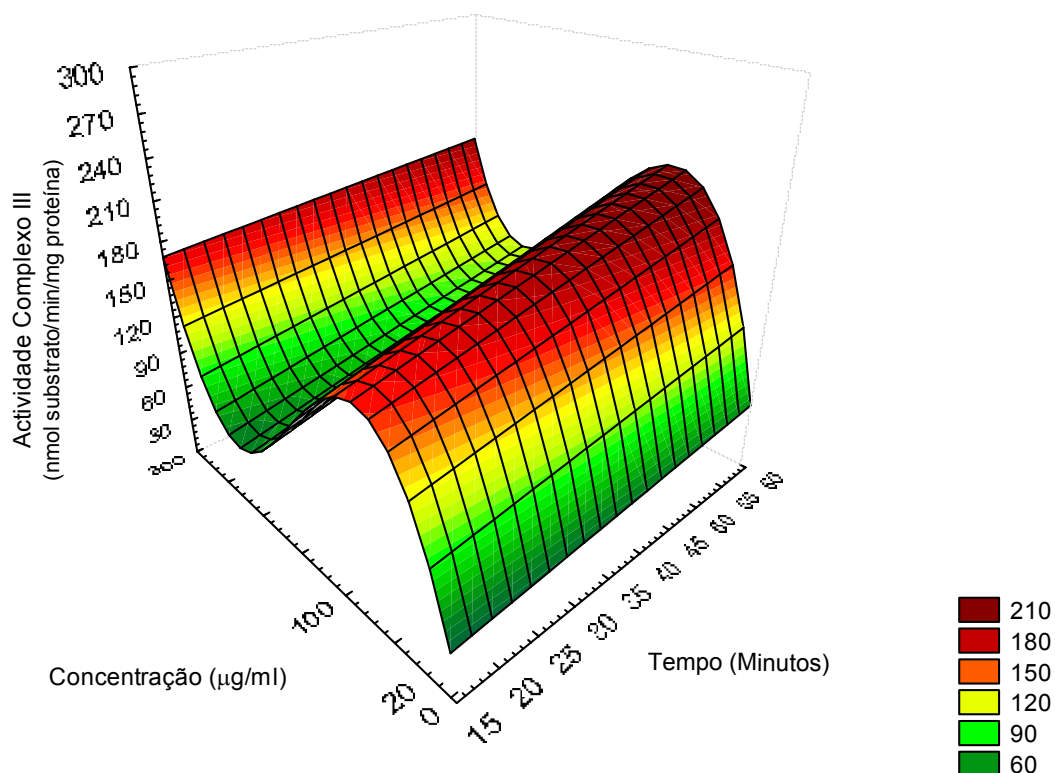
A partir das comparações múltiplas verifica-se que aos 15 minutos de exposição, a concentração 100 μg/ml difere de todas as outras ( $p=0,001$  para controlo,  $p=0,001$  para 4 μg/ml,  $p=0,005$  para 20 μg/ml e  $p=0,001$  para 300 μg/ml). Todas as outras concentrações, 0, 4, 20 e 300 μg/ml, são iguais entre si em relação à actividade do complexo III.

Aos 60 minutos de exposição, as concentrações 20 e 100  $\mu\text{g/ml}$  não diferem entre si,  $p=0,970$  sendo nestas atingido o valor máximo do complexo III. Estas duas concentrações diferem das restantes três, 0, 4 e 300  $\mu\text{g/ml}$ . Para a concentração 20  $\mu\text{g/ml}$  como para a concentração 100  $\mu\text{g/ml}$ , temos  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,001$  respectivamente para as comparações com as outras três concentrações.

Em cada concentração realizaram-se as comparações entre os dois tempos de exposição. Apenas foi encontrada diferença estatisticamente significativa na concentração 20  $\mu\text{g/ml}$ . Temos  $p=1,000$  no controlo,  $p=1,000$  para 4  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p=0,001$  para 20  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p=0,631$  para 100  $\mu\text{g/ml}$  e  $p=1,000$  para 300  $\mu\text{g/ml}$ .

Aos 15 minutos de exposição, da comparação do controlo com as concentrações 4, 20, 100 e 300  $\mu\text{g/ml}$ , apenas existe diferença no terceiro caso,  $p=0,994$ ,  $p=1,000$ ,  $p < 0,001$  e  $p=1,000$  respectivamente. Aos 60 minutos de exposição o controlo difere das concentrações 20 e 100  $\mu\text{g/ml}$ , com  $p < 0,001$  nos dois casos. Para 4  $\mu\text{g/ml}$   $p=0,953$  e para 300  $\mu\text{g/ml}$   $p=1,000$ .

Como a interacção é significativa, é possível representar geometricamente a relação existente entre os dois factores fixos, tempo de exposição e concentração, e a actividade do Complexo III através de uma superfície de resposta a três dimensões (figura 17). A partir desta superfície, dando um valor para o tempo de exposição, em minutos, e um valor para a concentração, em  $\mu\text{g/ml}$ , é possível estimar a actividade do Complexo III.



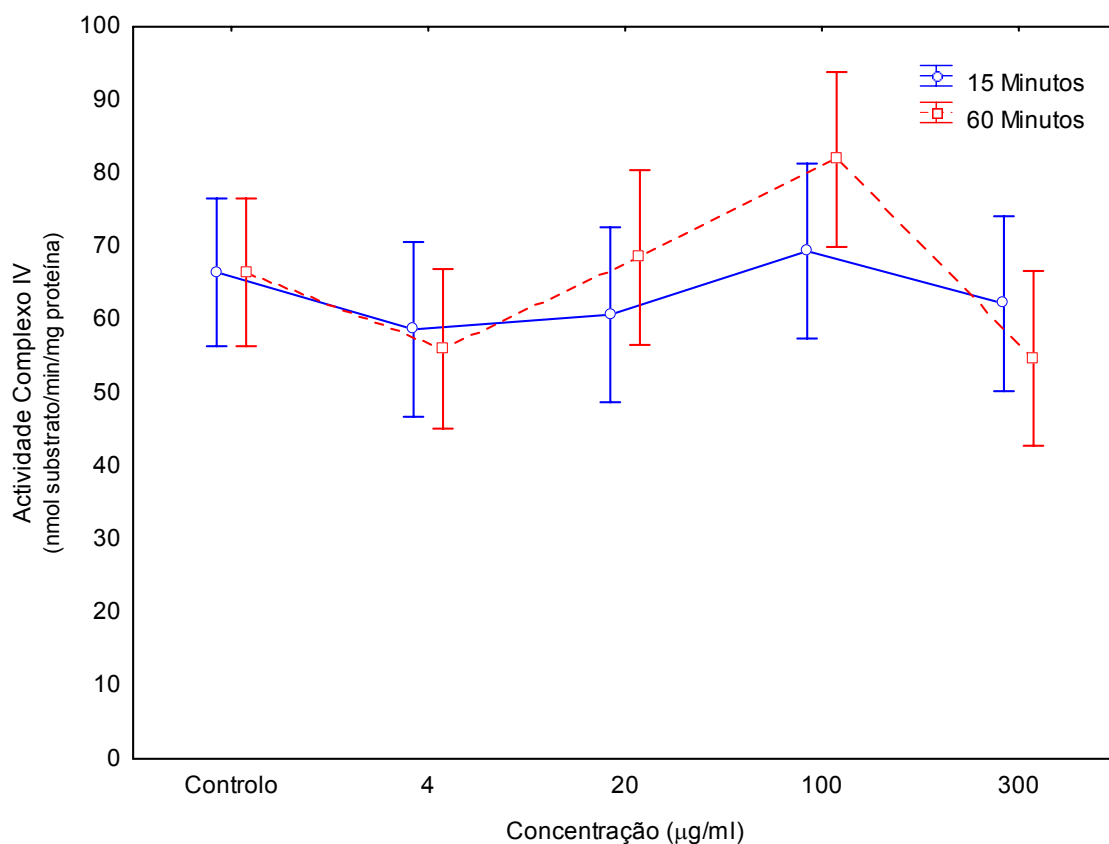
**Figura 17** - Representação gráfica tridimensional da superfície de resposta para a actividade do Complexo III em função da concentração de propofol e do tempo de exposição.

Os valores mais elevados de actividade do Complexo III são observados quando o tempo de observação é de 60 minutos e as concentrações de propofol estão próximas de 100 μg/ml. Os valores mais baixos são observados quando temos concentração 0 ou próxima de 300 μg/ml aos 15 minutos de observação.

## Complexo IV

Relativamente ao complexo IV (figura 18), observou-se que: para o tempo de exposição de 15 minutos, a actividade deste complexo mantém-se quase constante em todas as concentrações. Já para o tempo de exposição de 60 minutos, a actividade começa por diminuir ligeiramente entre o controlo e a concentração 4  $\mu\text{g/ml}$ , aumentando progressivamente até à concentração 100  $\mu\text{g/ml}$  e seguindo-se uma diminuição na concentração 300  $\mu\text{g/ml}$ .

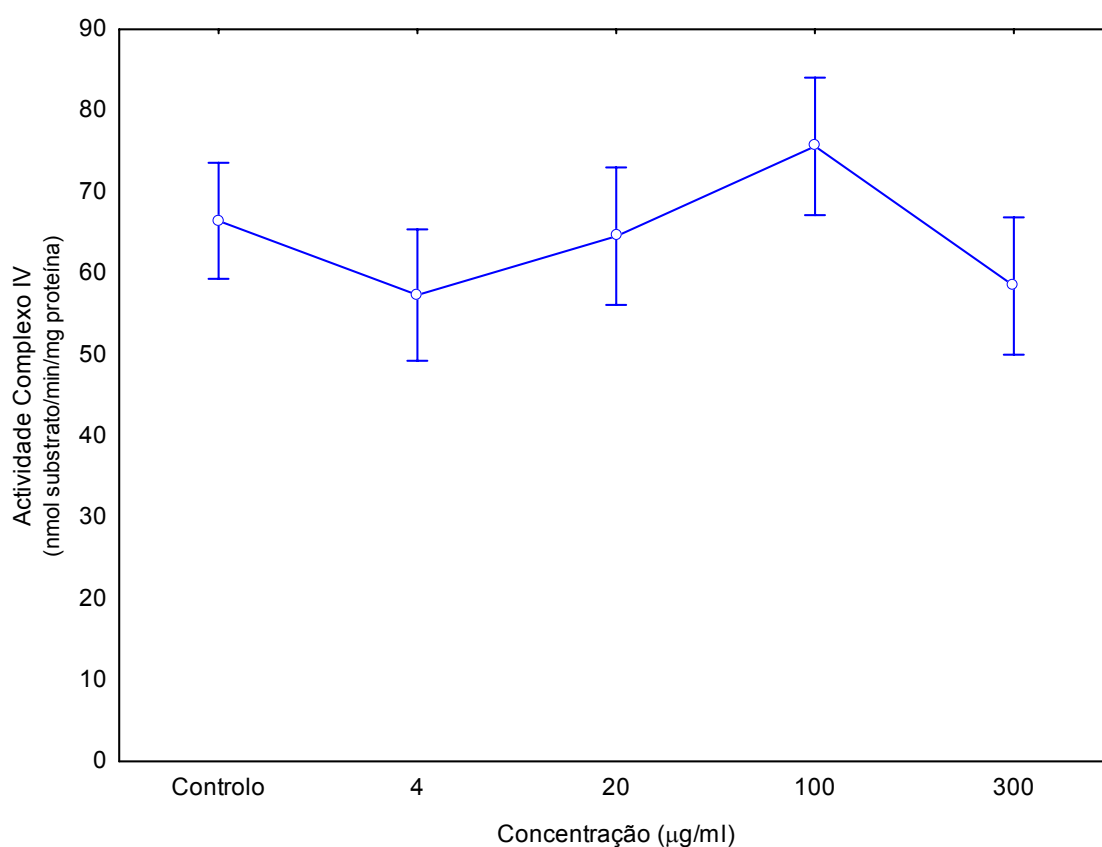
Quando comparamos os valores do complexo IV nos dois instantes de tempo, notamos que o comportamento é idêntico em todas as concentrações. Não parece existir diferença estatisticamente significativa entre os dois instantes de tempos em todas as concentrações.



**Figura 18** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança da actividade do complexo IV, em cada concentração de propofol, segundo os dois tempos de exposição.



A análise factorial para os dados relativos à actividade do Complexo IV revelou que a interacção entre os dois factores fixos, tempos de exposição e concentração de propofol não é significativa,  $p=0,452$ . Assim, os efeitos da concentração e do tempo de exposição são analisados em separado. O efeito da concentração na actividade do Complexo IV é significativo,  $p=0,023$ , já o efeito do tempo de exposição não é significativo,  $p=0,574$ . A figura 19 apresenta os valores da actividade do Complexo IV para as diferentes concentrações de propofol.



**Figura 19** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança da actividade do complexo IV em cada concentração de propofol.

Recorreu-se às comparações múltiplas para saber quais as concentrações que diferem entre si. Apenas a concentração 100 mg/ml difere de 4 µg/ml,  $p=0,022$

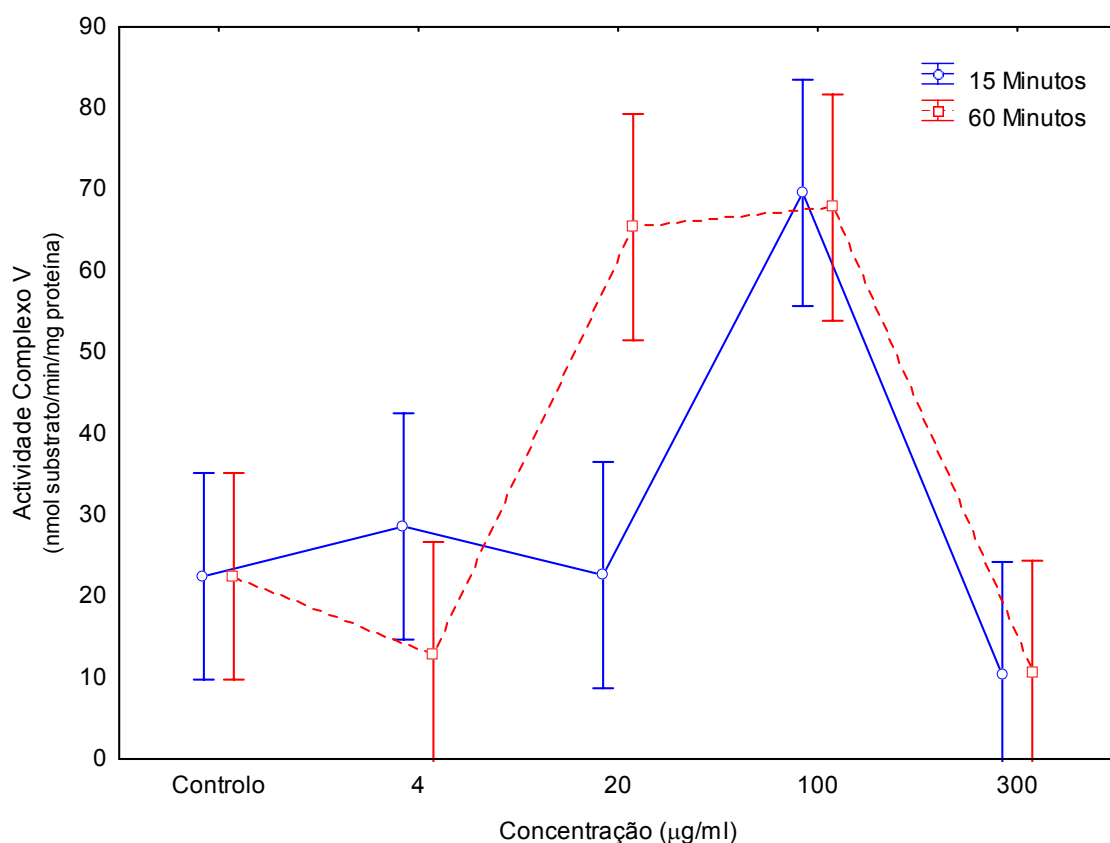
Todas as outras concentrações apresentam, entre si, valores iguais de actividade do complexo IV.

Da comparação de cada uma das concentrações em relação ao controlo concluiu-se que nenhuma delas difere deste,  $p=0,274$  para  $4 \mu\text{g/ml}$ ,  $p=0,992$  para  $20 \mu\text{g/ml}$ ,  $p=0,303$  para  $100 \mu\text{g/ml}$  e  $p=0,423$  para  $300 \mu\text{g/ml}$ .

## Complexo V

Relativamente à actividade do complexo V (figura 20), observou-se que para o tempo de exposição de 15 minutos, a sua actividade mantém-se quase constante nas concentrações 0, 4 e 20  $\mu\text{g/ml}$  observando-se uma subida muito acentuada na concentração 100, seguida de uma descida também bastante pronunciada para os 300  $\mu\text{g/ml}$ . Já para o tempo de exposição de 60 minutos, a actividade do complexo V começa por diminuir ligeiramente entre o controlo e a concentração 4  $\mu\text{g/ml}$ , aumentando marcadamente na concentração 20  $\mu\text{g/ml}$  e mantendo-se na concentração 100  $\mu\text{g/ml}$ . Segue-se uma diminuição também acentuada para a concentração 300  $\mu\text{g/ml}$ . Observa-se que é atingido um valor máximo do complexo V aos 15 minutos na concentração 100  $\mu\text{g/ml}$ , enquanto o valor máximo aos 60 minutos é atingido aos 20  $\mu\text{g/ml}$  e mantém-se nos 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Quando comparamos os valores de actividade do complexo V nos dois instantes de tempo, notamos que o comportamento não é homogéneo em todas as concentrações. Os valores parecem idênticos nos dois tempos para as concentrações 0, 4, 100 e 300  $\mu\text{g/ml}$ . No entanto, para a concentração 20  $\mu\text{g/ml}$  o complexo V assume valores muito mais elevados aos 60 minutos.



**Figura 20** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança da actividade do complexo V, em cada concentração de propofol, segundo os dois tempos de exposição.

A análise factorial para os dados relativos à actividade do Complexo V revelou que a interacção entre os dois factores fixos, tempos de exposição e concentração de propofol é significativa,  $p=0,002$ . Assim, o efeito da concentração tem de ser estudado em separado para cada tempo de exposição e o efeito do tempo tem de ser estudado em separado para cada concentração.

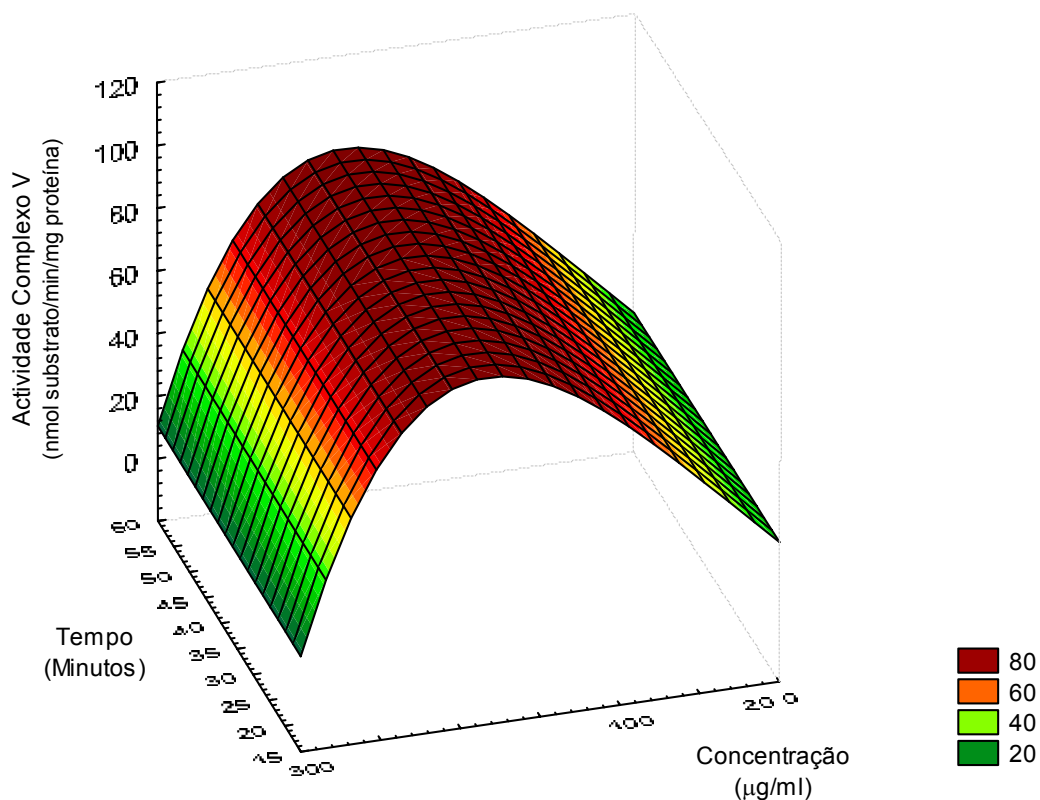
A partir das comparações múltiplas é possível verificar que aos 15 minutos de exposição, a concentração 100 μg/ml difere de todas as outras ( $p < 0,001$  para controlo,  $p=0,005$  para 4 μg/ml,  $p=0,001$  para 20 μg/ml e  $p < 0,001$  para 300 μg/ml). Todas as outras concentrações 0, 4, 20 e 300 μg/ml, são iguais entre si em relação à actividade do complexo V.

Aos 60 minutos de exposição, as concentrações 20 e 100  $\mu\text{g/ml}$  não diferem entre si,  $p=1,000$  sendo nestas atingido o valor máximo de actividade. Estas duas concentrações diferem das restantes três 0, 4 e 300  $\mu\text{g/ml}$ . Para a concentração 20  $\mu\text{g/ml}$  temos,  $p=0,002$  para o controlo,  $p < 0,001$  para 4  $\mu\text{g/ml}$  e  $p < 0,001$  para 300  $\mu\text{g/ml}$ . Para a concentração 100  $\mu\text{g/ml}$ , temos  $p=0,001$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,001$  respectivamente para as comparações com as mesmas concentrações.

Em cada concentração realizaram-se as comparações entre os dois tempos de exposição. Apenas foi encontrada diferença estatisticamente significativa na concentração 20  $\mu\text{g/ml}$ . Temos,  $p=1,000$  no controlo,  $p=0,829$  para 4  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p=0,003$  para 20  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p=1,000$  para 100  $\mu\text{g/ml}$  e  $p=1,000$  para 300  $\mu\text{g/ml}$ .

Realizaram-se ainda comparações de cada uma das concentrações em relação ao controlo. Na presença da interacção, é necessário fazer esta análise em separado para os 15 minutos e os 60 minutos de exposição. Aos 15 minutos de exposição, da comparação do controlo com as concentrações 4, 20, 100 e 300  $\mu\text{g/ml}$ , apenas existe diferença no terceiro caso,  $p=0,993$ ,  $p=1,000$ ,  $p < 0,001$  e  $p=0,741$  respectivamente. Aos 60 minutos de exposição o controlo difere das concentrações 20 e 100  $\mu\text{g/ml}$ , com  $p < 0,001$  nos dois casos. Para 4  $\mu\text{g/ml}$   $p=0,898$  e para 300  $\mu\text{g/ml}$   $p=0,754$ .

Como a interacção é significativa, é possível representar geometricamente a relação existente entre os dois factores fixos e a actividade do Complexo V através de uma superfície de resposta a três dimensões (figura 21). A partir desta superfície, dando um valor para o tempo de exposição, em minutos, e um valor para a concentração, em  $\mu\text{g/ml}$ , é possível estimar a actividade do Complexo V.

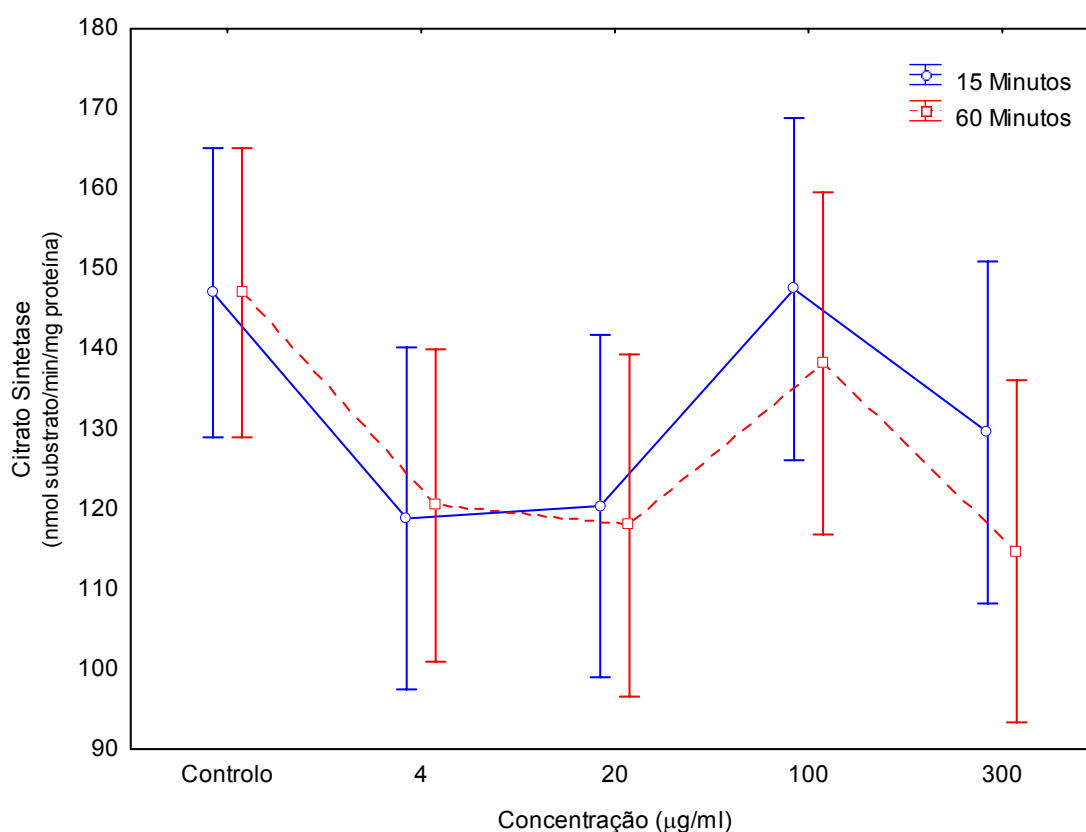


**Figura 21** - Representação gráfica tridimensional da curva de resposta para CV em função da concentração de propofol e tempo.

Os valores mais elevados de actividade do complexo V são observados quando as concentrações estão entre 100 e 200  $\mu\text{g/ml}$  para qualquer tempo de observação. Os valores mais baixos são observados quando temos concentrações 0 e 300  $\mu\text{g/ml}$  para qualquer tempo de observação.

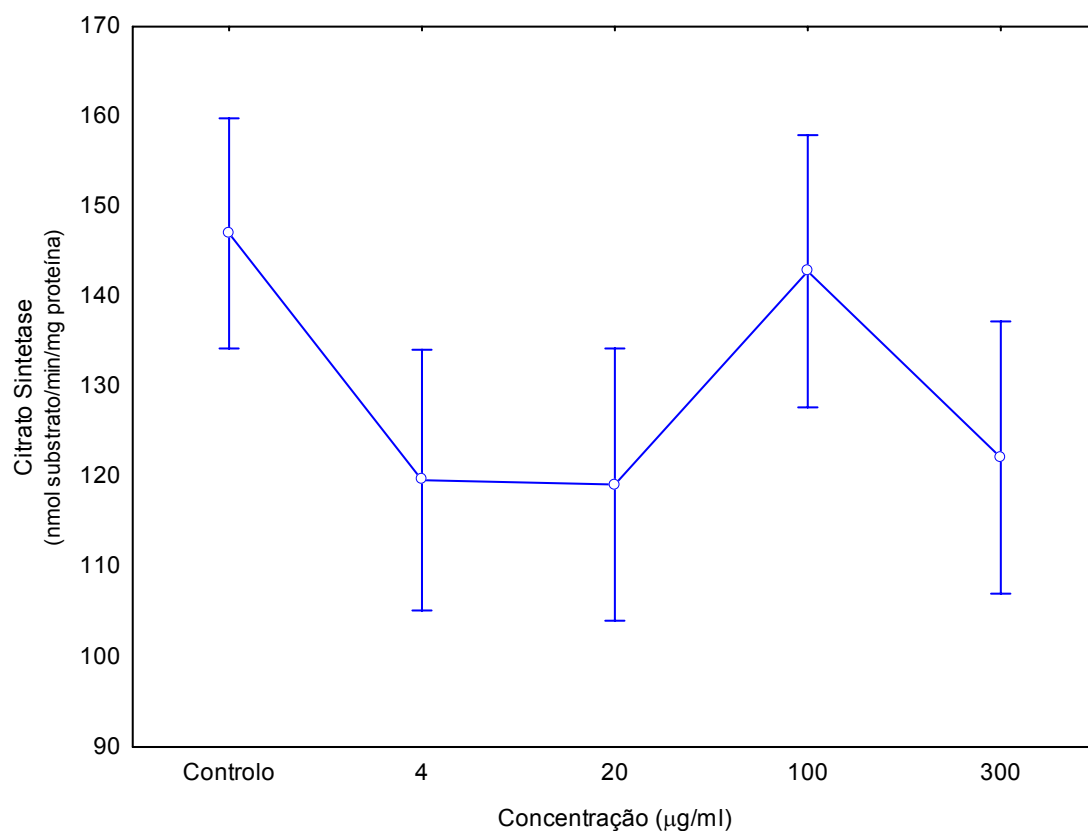
## Citrato Sintetase (CS)

Relativamente ao Citrato Sintetase (CS) (figura 22), observou-se que: para o tempo de exposição de 15 minutos, a CS diminui entre o controlo e a concentração 4  $\mu\text{g/ml}$ , valor que se mantém idêntico na concentração 20  $\mu\text{g/ml}$ . Os valores de CS aumentam aos 100  $\mu\text{g/ml}$ , voltando a baixar aos 300  $\mu\text{g/ml}$  para valores idênticos observados aos 4 e 20  $\mu\text{g/ml}$ . Aos 60 minutos de exposição, o comportamento da CS é exactamente idêntico ao que se observou aos 15 minutos. Quando comparamos os valores do CS nos dois instantes de tempo, notamos que o comportamento é idêntico em todas as concentrações. Não parece existir diferença estatisticamente significativa entre os dois instantes de tempos em todas as concentrações.



**Figura 22** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança da Citrato Sintetase, em cada concentração de propofol, segundo os dois tempos de exposição.

A partir da análise factorial para os dados relativos à actividade da Citrato Sintetase conclui-se que a interacção entre os dois factores fixos, tempo de exposição e concentração de propofol não é significativa,  $p=0,923$ . Assim, os efeitos da concentração e do tempo de exposição são analisados em separado. O efeito da concentração na actividade da CS é significativo,  $p=0,009$ , já o efeito do tempo de exposição não é significativo,  $p=0,444$ . A figura 23 apresenta os valores da CS para a concentração.



**Figura 23** - Gráfico das médias amostrais e respectivos intervalos de confiança da CS, em cada concentração de propofol.

Recorreu-se às comparações múltiplas para saber quais as concentrações que diferem entre si. Apenas a concentração 4 µg/ml difere do controlo,  $p=0,048$ . Todas as outras concentrações apresentam, entre si, valores iguais para a CS.



### 3.2.2 Actividades dos complexos da CRM corrigidas para a CS

Na tabela 3, estão representadas todas as actividades relativas à avaliação da actividade dos complexos da CRM corrigidas para a CS, em resposta à incubação com diferentes concentrações de propofol, em dois tempos de exposição, 15 e 60 minutos.

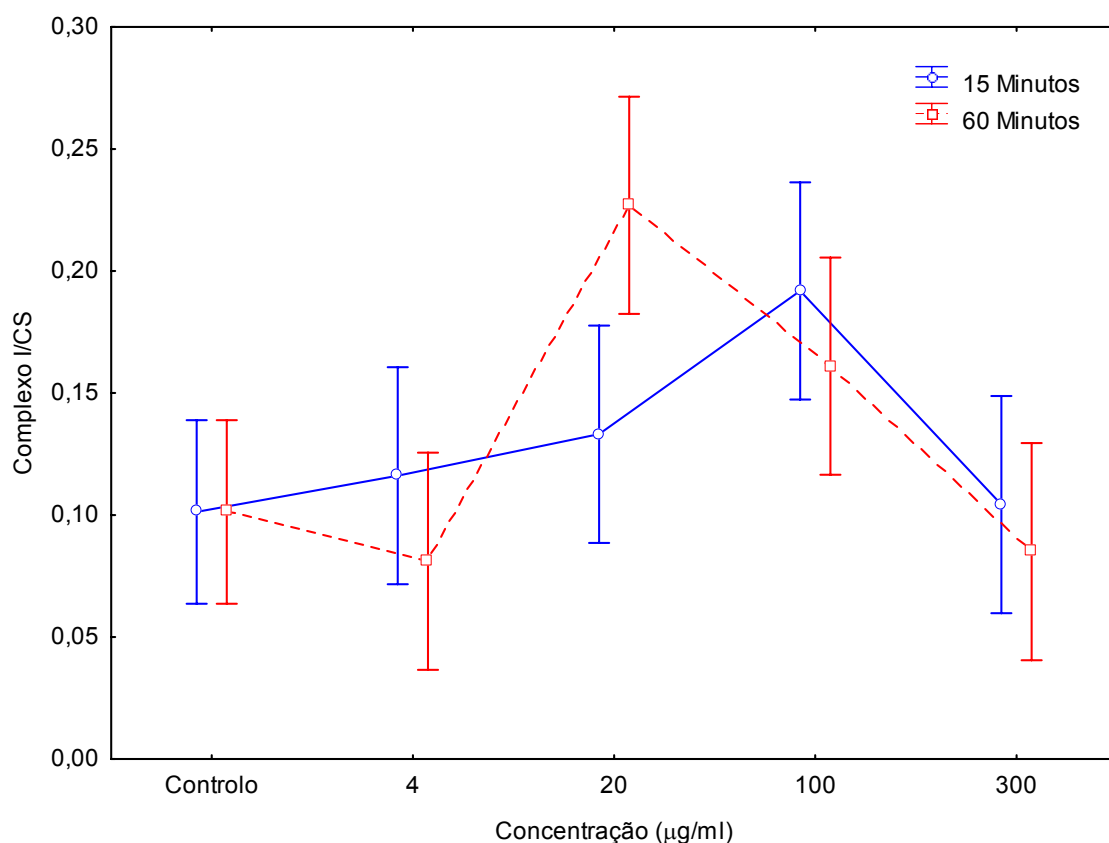
**Tabela 3** - Resultados das actividades dos complexos da CRM corrigidas para a CS, em resposta à incubação com diferentes concentrações de propofol, em dois tempos de exposição.

<b>Tempo de Exposição</b>		<b>Concentração</b>				
		<b>0 µg/ml</b>	<b>4 µg/ml</b>	<b>20 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>300 µg/ml</b>
<b>Complexo I/CS</b>						
<b>15 Minutos</b>	Média± DP	N=7 0,10 ± 0,03	N=5 0,12 ± 0,03	N=5 0,13 ± 0,03	N=5 0,19 ± 0,03	N=5 0,10 ± 0,04
	Min-Máx	0,08 - 0,15	0,08 - 0,16	0,08 - 0,16	0,16 - 0,23	0,05 - 0,15
<b>60 Minutos</b>	Média± DP	N=7 0,10 ± 0,03	N=5 0,08 ± 0,04	N=5 0,23 ± 0,12	N=5 0,16 ± 0,06	N=5 0,09 ± 0,01
	Min-Máx	0,08 - 0,15	0,03 - 0,15	0,11 - 0,40	0,10 - 0,25	0,08 - 0,10
<b>Complexo II/CS</b>						
<b>15 Minutos</b>	Média± DP	N=7 0,10 ± 0,02	N=5 0,15 ± 0,03	N=5 0,16 ± 0,02	N=5 0,12 ± 0,03	N=5 0,11 ± 0,01
	Min-Máx	0,08 - 0,13	0,10 - 0,18	0,13 - 0,18	0,08 - 0,14	0,11 - 0,12
<b>60 Minutos</b>	Média± DP	N=7 0,10 ± 0,02	N=6 0,10 ± 0,02	N=5 0,13 ± 0,03	N=5 0,13 ± 0,01	N=5 0,12 ± 0,02
	Min-Máx	0,08 - 0,13	0,08 - 0,13	0,09 - 0,17	0,12 - 0,14	0,09 - 0,15
<b>Complexo III/CS</b>						
<b>15 Minutos</b>	Média± DP	N=7 0,37 ± 0,16	N=5 0,36 ± 0,04	N=5 0,50 ± 0,16	N=5 1,07 ± 0,50	N=5 0,36 ± 0,05
	Min-Máx	0,23 - 0,65	0,31 - 0,40	0,31 - 0,71	0,54 - 1,85	0,30 - 0,42
<b>60 Minutos</b>	Média± DP	N=7 0,37 ± 0,16	N=6 0,32 ± 0,19	N=5 1,47 ± 0,16	N=5 1,44 ± 0,18	N=5 0,49 ± 0,17
	Min-Máx	0,23 - 0,65	0,14 - 0,56	1,23 - 1,67	1,21 - 1,72	0,24 - 0,66
<b>Complexo IV/CS</b>						
<b>15 Minutos</b>	Média± DP	N=7 0,46 ± 0,05	N=5 0,49 ± 0,04	N=5 0,51 ± 0,04	N=5 0,47 ± 0,09	N=5 0,49 ± 0,04
	Min-Máx	0,36 - 0,51	0,46 - 0,55	0,45 - 0,56	0,33 - 0,57	0,45 - 0,54
<b>60 Minutos</b>	Média± DP	N=7 0,46 ± 0,05	N=6 0,47 ± 0,14	N=5 0,59 ± 0,07	N=5 0,59 ± 0,15	N=5 0,49 ± 0,08
	Min-Máx	0,36 - 0,51	0,35 - 0,73	0,49 - 0,66	0,40 - 0,82	0,40 - 0,56
<b>Complexo V/CS</b>						
<b>15 Minutos</b>	Média± DP	N=6 0,14 ± 0,07	N=5 0,24 ± 0,13	N=5 0,18 ± 0,06	N=5 0,48 ± 0,15	N=5 0,08 ± 0,04
	Min-Máx	0,06 - 0,26	0,11 - 0,40	0,12 - 0,27	0,35 - 0,73	0,03 - 0,13
<b>60 Minutos</b>	Média± DP	N=6 0,14 ± 0,07	N=5 0,10 ± 0,06	N=5 0,54 ± 0,18	N=5 0,50 ± 0,16	N=5 0,09 ± 0,04
	Min-Máx	0,06 - 0,26	0,04 - 0,19	0,29 - 0,76	0,32 - 0,67	0,04 - 0,13

## Complexo I/CS

Relativamente à actividade do complexo I corrigida para a CS (figura 24), observou-se que para o tempo de exposição de 15 minutos, a relação complexo I/CS aumenta gradualmente desde o controlo até à concentração 100  $\mu\text{g/ml}$  observando-se uma queda acentuada na concentração 300  $\mu\text{g/ml}$ . Já para o tempo de exposição de 60 minutos, esta relação começa por diminuir ligeiramente entre o controlo e a concentração 4  $\mu\text{g/ml}$ , aumentando marcadamente na concentração 20  $\mu\text{g/ml}$  e seguindo-se uma diminuição gradual nas concentrações 100 e 300  $\mu\text{g/ml}$ . Observa-se que é atingido um valor máximo de actividade aos 15 minutos na concentração 100  $\mu\text{g/ml}$ , enquanto o valor máximo aos 60 minutos é atingido aos 20  $\mu\text{g/ml}$ .

Quando comparamos os valores da relação complexo I/CS nos dois instantes de tempo, notamos que o comportamento não é homogéneo em todas as concentrações. Os valores parecem idênticos nos dois tempos para as concentrações 0, 4, 100 e 300  $\mu\text{g/ml}$ . No entanto, para a concentração 20  $\mu\text{g/ml}$  o complexo assume valores mais elevados aos 60 minutos.



**Figura 24** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança da relação Complexo I/CS, em cada concentração de propofol, segundo os dois tempos de exposição.

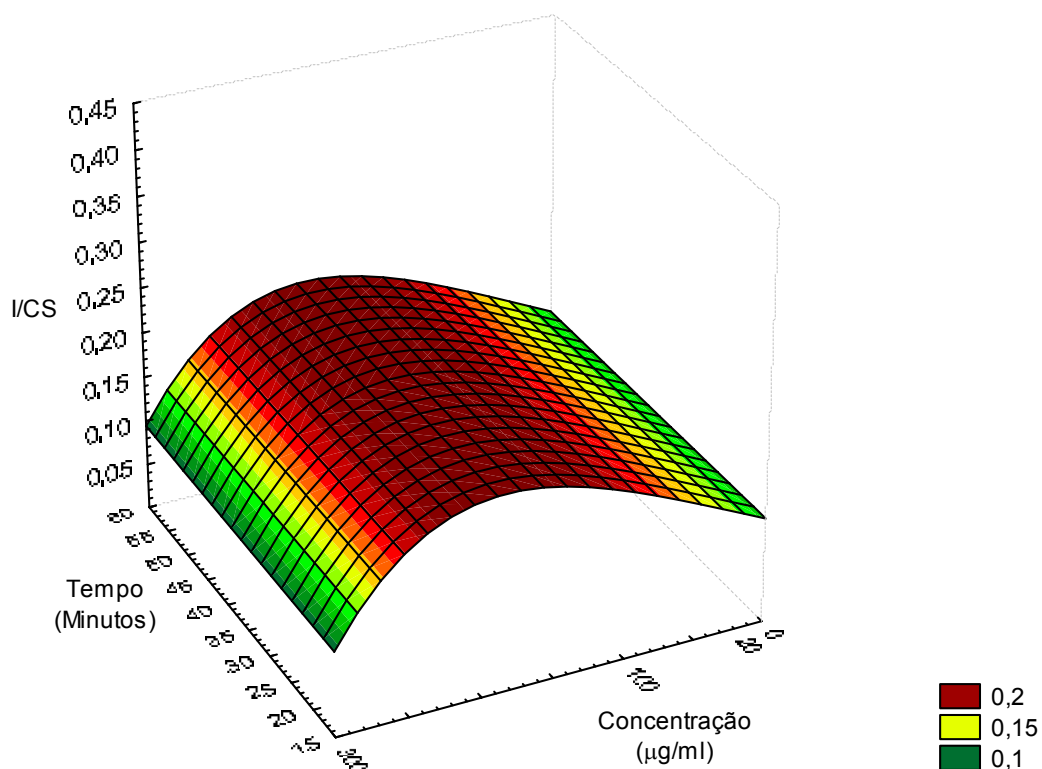
A análise factorial para os dados relativos à actividade do Complexo I corrigida para a CS, revelou que a interacção entre os dois factores fixos, tempos de exposição e concentração de propofol é significativa,  $p=0.026$ . Assim, o efeito da concentração tem de ser estudado em separado para cada tempo de exposição e o efeito do tempo tem de ser estudado em separado para cada concentração.

A partir das comparações múltiplas é possível verificar que aos 15 minutos de exposição, não há diferenças estatisticamente significativas para as diferentes concentrações. Aos 60 minutos de exposição, a concentração 20 e 100 µg/ml não diferem entre si,  $p=0,530$ . A concentração 20 µg/ml difere das restantes três, 0, 4 e 300 µg/ml,  $p=0,003$  para o controlo,  $p=0,001$  para 4 µg/ml e  $p=0,002$  para 300 µg/ml. A concentração 100 µg/ml não se distingue das restantes.

Em cada concentração realizaram-se as comparações entre os dois tempos de exposição. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas,  $p=1,000$  no controlo,  $p=0,980$  para  $4 \mu\text{g/ml}$ ,  $p=0,107$  para  $20 \mu\text{g/ml}$ ,  $p=0,992$  para  $100 \mu\text{g/ml}$  e  $p=1,000$  para  $300 \mu\text{g/ml}$ .

Realizaram-se ainda comparações entre cada uma das concentrações em relação ao controlo. Aos 15 minutos de exposição, da comparação do controlo com as concentrações 4, 20, 100 e  $300 \mu\text{g/ml}$ , apenas existe diferença no terceiro caso,  $p=0,999$ ,  $p=0,890$ ,  $p=0,034$  e  $p=1,000$  respectivamente. Aos 60 minutos de exposição o controlo apenas difere da concentração  $20 \mu\text{g/ml}$ , com  $p=0,001$ . Para  $4 \mu\text{g/ml}$   $p=0,823$ , para  $100 \mu\text{g/ml}$   $p=0,282$  e para  $300 \mu\text{g/ml}$   $p=0,999$ .

Como a interacção é significativa, é possível representar geometricamente a relação existente entre os dois factores fixos e a relação Complexo I/CS através de uma superfície de resposta a três dimensões (figura 25). A partir desta superfície, dado um valor para o tempo de exposição, em minutos, e um valor para a concentração, em  $\mu\text{g/ml}$ , é possível estimar a actividade do Complexo I corrigida para a CS.



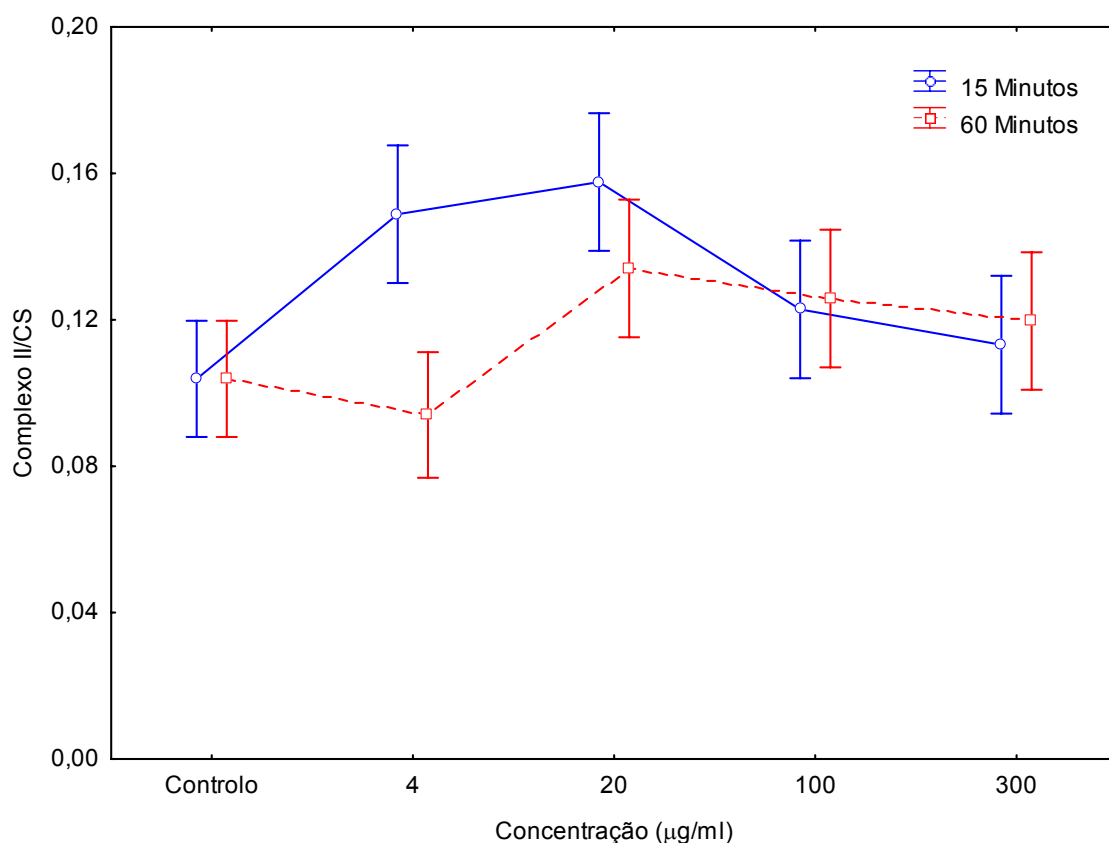
**Figura 25** - Representação gráfica tridimensional da superfície de resposta para a relação complexo I/CS em função da concentração de propofol e tempo de observação.

Os valores mais elevados de actividade do complexo I corrigida para a CS são observados quando as concentrações estão entre 100 e 200 µg/ml para qualquer valor do tempo. Os valores mais baixos são observados quando temos concentrações 0 ou 300 µg/ml para qualquer tempo de observação.

## Complexo II/CS

Relativamente à actividade do complexo II corrigida para a CS (figura 26), observou-se que para o tempo de exposição de 15 minutos, a relação complexo II/CS aumenta gradualmente desde o controlo até à concentração 20  $\mu\text{g/ml}$  observando-se uma queda nas concentrações 100 e 300  $\mu\text{g/ml}$ . Já para o tempo de exposição de 60 minutos, esta relação começa por diminuir muito ligeiramente entre o controlo e a concentração 4  $\mu\text{g/ml}$ , aumentando na concentração 20  $\mu\text{g/ml}$  e seguindo-se uma diminuição ténue nas concentrações 100 e 300  $\mu\text{g/ml}$ . Observa-se que é atingido um valor máximo do complexo II/CS aos 15 e 60 minutos na concentração 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Quando comparamos os valores do complexo II/CS nos dois instantes de tempo, notamos que o comportamento não é homogéneo em todas as concentrações. Os valores parecem idênticos nos dois tempos para as concentrações 0, 20, 100 e 300  $\mu\text{g/ml}$ . No entanto, para a concentração 4  $\mu\text{g/ml}$  o complexo assume valores mais elevados aos 15 minutos.



**Figura 26** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança da relação CII/CS, em cada concentração, segundo os dois tempos de observação.

A análise factorial para os dados relativos à actividade do Complexo II/CS confirma que a interacção entre os dois factores fixos, tempos de exposição e concentração de propofol é significativa,  $p=0,007$ . Assim, o efeito da concentração tem de ser estudado em separado para cada tempo de exposição e o efeito do tempo tem de ser estudado em separado para cada concentração.

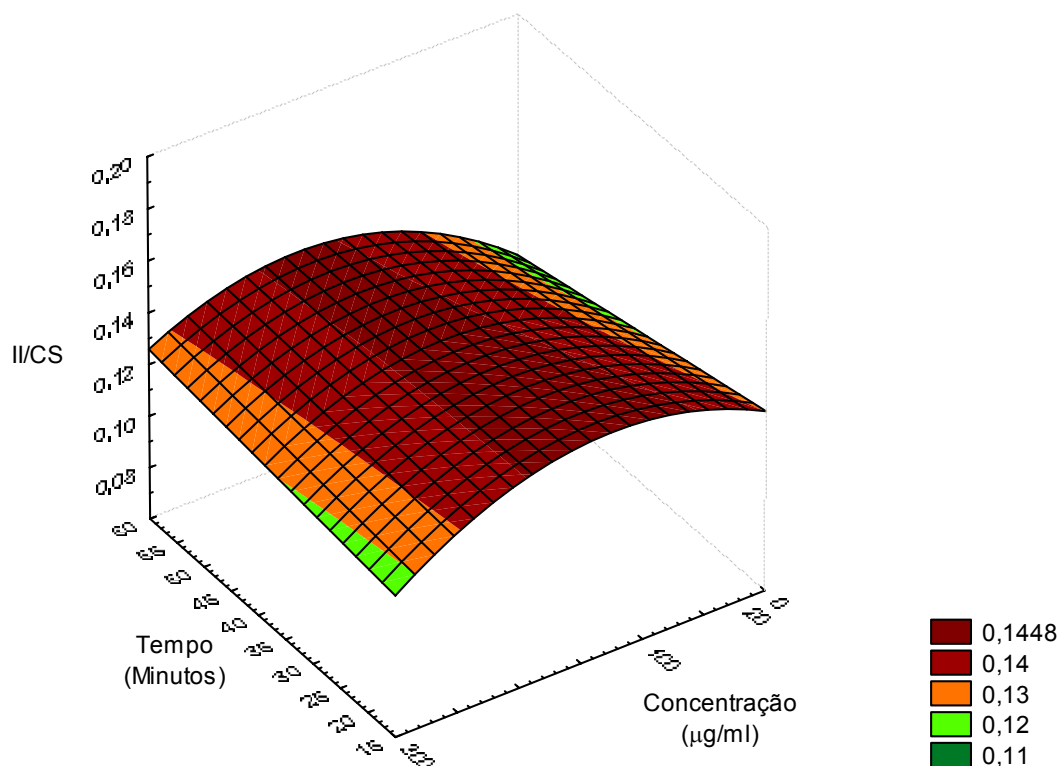
A partir das comparações múltiplas é possível verificar que aos 15 minutos de exposição, o controlo difere das concentrações 4 e 20 μg/ml,  $p=0,020$  e  $p=0,003$ . As concentrações 20 e 300 μg/ml diferem,  $p=0,045$ . As restantes comparações a 15 minutos não apresentam diferenças estatisticamente significativas. Aos 60 minutos de exposição, as concentrações não diferem entre si.

Em cada concentração realizaram-se as comparações entre os dois tempos de exposição. Apenas a diferença na concentração 4 µg/ml é estatisticamente significativa  $p=0,003$ , as restantes não são,  $p=1,000$  no controlo,  $p=0,739$  para 20 µg/ml,  $p=1,000$  para 100 µg/ml e  $p=1,000$  para 300 µg/ml.

Realizaram-se ainda comparações entre cada uma das concentrações em relação ao controlo. Aos 15 minutos de exposição, da comparação do controlo com as concentrações 4, 20, 100 e 300 µg/ml,  $p=0,005$ ,  $p=0,001$ ,  $p=0,575$  e  $p=0,984$  respectivamente. Aos 60 minutos de exposição o controlo não difere das restantes concentrações,  $p=0,968$  para 4 µg/ml,  $p=0,114$  para 20 µg/ml,  $p=0,407$  para 100 µg/ml e  $p=0,761$  para 300 µg/ml.

Como a interacção é significativa, é possível representar geometricamente a relação existente entre os dois factores fixos e a actividade do Complexo II corrigida para a CS, através de uma superfície de resposta a três dimensões, (figura 27). A partir desta superfície, dado um valor para o tempo de exposição, em minutos, e um valor para a concentração, em µg/ml, é possível estimar a relação Complexo II/CS.





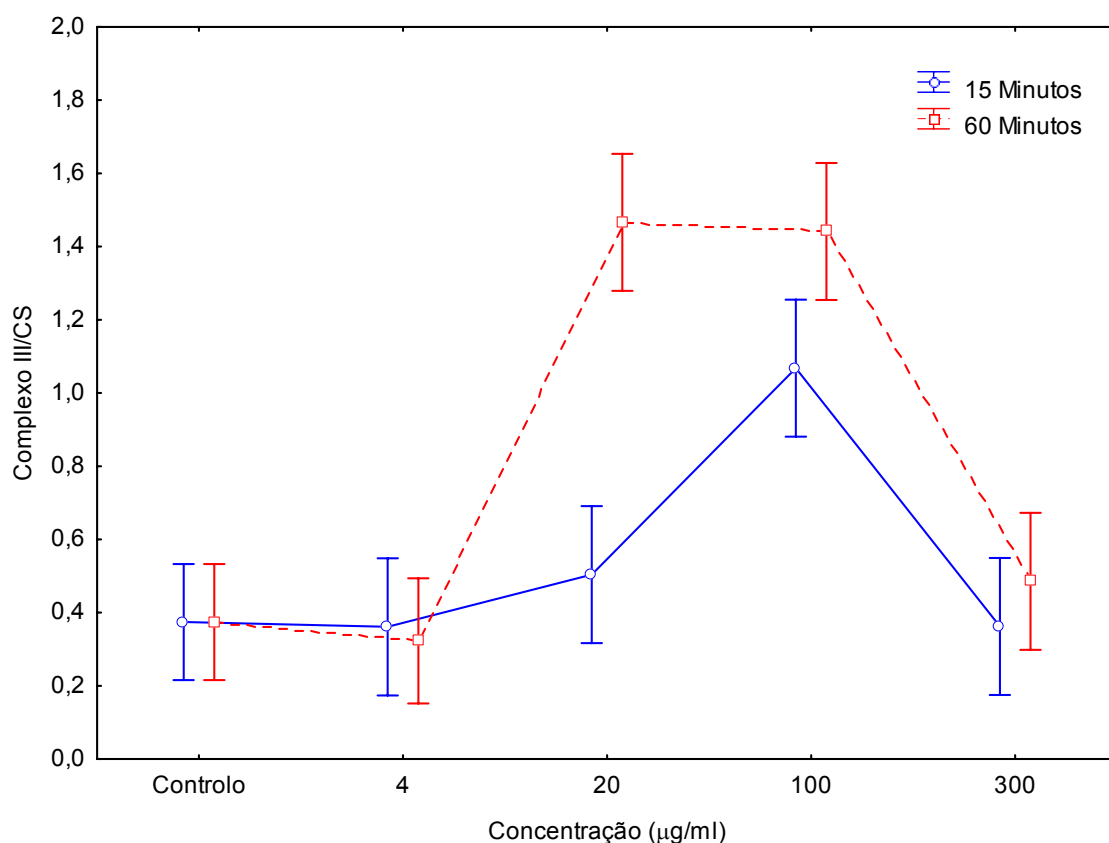
**Figura 27** - Representação gráfica tridimensional da superfície de resposta para a relação II/CS em função da concentração de propofol e tempo de observação.

Os valores mais elevados da variável dependente são observados quando o tempo de observação é de 60 minutos e as concentrações estão entre 100 e 200 µg/ml e quando a observação é feita aos 15 minutos com concentrações a variar entre 150 e 200 µg/ml. Os valores mais baixos são observados quando temos concentração 0 para 60 minutos de observação e quando temos concentração próxima de 300 µg/ml aos 15 minutos de observação.

## Complexo III/CS

Relativamente à actividade do complexo III corrigida para a CS, (figura 28), observou-se que para o tempo de exposição de 15 minutos, a relação complexo III/CS aumenta ligeiramente desde o controlo até à concentração 20  $\mu\text{g/ml}$  observando-se um aumento acentuado na concentração 100 e uma queda acentuada na concentração 300  $\mu\text{g/ml}$ . Já para o tempo de exposição de 60 minutos, o complexo III/CS começa por se manter entre o controlo e a concentração 4  $\mu\text{g/ml}$ , aumentando na concentração 20  $\mu\text{g/ml}$  e mantendo-se na concentração 100  $\mu\text{g/ml}$ , a que se segue uma diminuição na concentração 300  $\mu\text{g/ml}$ . Observa-se que é atingido um valor máximo do complexo III/CS aos 15 minutos na concentração 100  $\mu\text{g/ml}$  e 60 minutos nas concentrações 20 e 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Quando comparamos os valores da relação complexo III/CS nos dois instantes de tempo, notamos que o comportamento não é homogéneo em todas as concentrações. Os valores parecem idênticos nos dois tempos para as concentrações 0, 4 e 300  $\mu\text{g/ml}$ . No entanto, para a concentração 4 e 20  $\mu\text{g/ml}$  o complexo assume valores mais elevados aos 60 minutos.



**Figura 28** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança para a relação Complexo III/CS, em cada tempo de observação, segundo as cinco concentrações de Propofol.

A análise factorial para os dados relativos à actividade do Complexo III corrigida para a CS confirma que a interacção entre os dois factores fixos, tempos de exposição e concentração de propofol é significativa,  $p < 0,001$ . Assim, o efeito da concentração tem de ser estudado em separado para cada tempo de exposição e o efeito do tempo tem de ser estudado em separado para cada concentração.

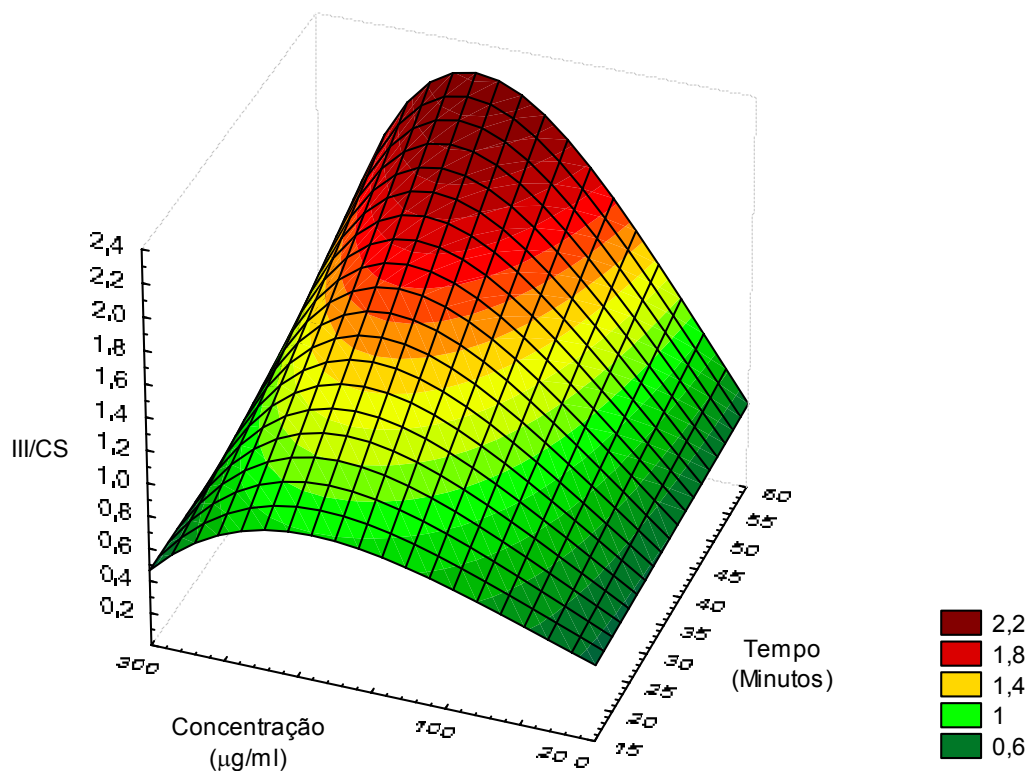
A partir das comparações múltiplas é possível verificar que aos 15 minutos de exposição, a concentração 100 µg/ml difere de todas as outras,  $p < 0,001$  para 0 µg/ml,  $p < 0,001$  para 4 µg/ml,  $p = 0,003$  para 20 µg/ml e  $p < 0,001$  para 300 µg/ml. As restantes comparações a 15 minutos não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Aos 60 minutos as concentrações 20 e 100  $\mu\text{g/ml}$  não diferem entre si,  $p=1,000$ . Estas duas diferem das restantes três concentrações. Tanto para 20 como para 100  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0,001$  nas comparações com as outras três, 0, 4 e 300  $\mu\text{g/ml}$ .

Em cada concentração realizaram-se as comparações entre os dois tempos de exposição. Apenas a diferença na concentração 20  $\mu\text{g/ml}$  é estatisticamente significativa  $p < 0,001$ , as restantes não,  $p=1,000$  no controlo,  $p=1,000$  para 4  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p=0,155$  para 100  $\mu\text{g/ml}$  e  $p=0,994$  para 300  $\mu\text{g/ml}$ .

Realizaram-se ainda comparações entre cada uma das concentrações em relação ao controlo. Aos 15 minutos de exposição, da comparação do controlo com as concentrações 4, 20, 100 e 300  $\mu\text{g/ml}$  temos  $p=1,000$ ,  $p=0,845$ ,  $p < 0,001$  e  $p=1,000$  respectivamente. Aos 60 minutos de exposição o controlo difere de duas concentrações,  $p=1,000$  para 4  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0,001$  para 20  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0,001$  para 100  $\mu\text{g/ml}$  e  $p=0,925$  para 300  $\mu\text{g/ml}$ .

Como a interacção é significativa, é possível representar geometricamente a relação existente entre os dois factores fixos e a actividade do Complexo III corrigida para a CS através de uma superfície de resposta a três dimensões, (figura 29). A partir desta superfície, dado um valor para o tempo de exposição, em minutos, e um valor para a concentração, em  $\mu\text{g/ml}$ , é possível estimar a relação Complexo III/CS.



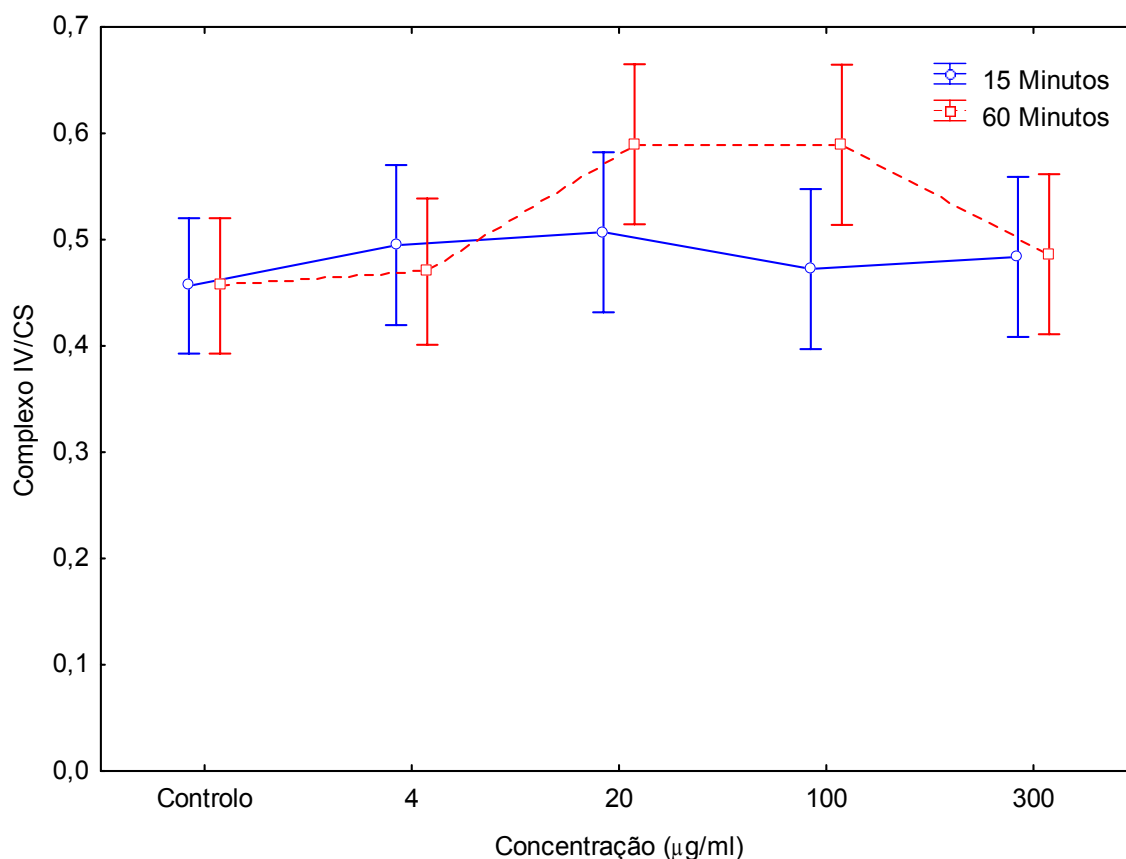
**Figura 29** - Representação gráfica tridimensional da superfície de resposta para relação III/CS em função da concentração de propofol e tempo de observação.

Da análise da superfície pode concluir-se que os valores mais elevados da variável dependente são observados quando o tempo de observação é de 60 minutos e as concentrações são próximas de 200  $\mu\text{g/ml}$ . Os valores mais baixos são observados quando temos concentração 0 para qualquer tempo de observação e quando temos concentração próxima de 300  $\mu\text{g/ml}$  aos 15 minutos de observação.

## Complexo IV/CS

Relativamente à actividade do complexo IV em relação à CS (figura 30), observou-se que para o tempo de exposição de 15 minutos, os valores do complexo mantêm-se quase constantes em todas as concentrações. Já para o tempo de exposição de 60 minutos a relação complexo IV/CS mantêm-se entre o controlo e a concentração 4  $\mu\text{g/ml}$  para depois aumentar ligeiramente na concentração 20  $\mu\text{g/ml}$ , mantendo-se na concentração 100  $\mu\text{g/ml}$ . O complexo voltar aos valores observados inicialmente na concentração 300  $\mu\text{g/ml}$ . As oscilações observadas aos 60 minutos não parecem ser acentuadas.

Quando comparamos os valores da relação complexo IV/CS nos dois instantes de tempo, notamos que o comportamento não é homogéneo em todas as concentrações. Os valores parecem idênticos nos dois tempos para as concentrações 0, 4 e 300  $\mu\text{g/ml}$ . No entanto, para a concentração 4 e 20  $\mu\text{g/ml}$  o complexo assume valores mais elevados aos 60 minutos, no entanto estas variações não parecer ser significativas.



**Figura 30** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança para o a relação Complexo IV/CS, em cada tempo de observação, segundo as cinco concentrações de Propofol.

A partir da análise factorial para os dados relativos à relação Complexo IV/CS conclui-se que a interacção entre os dois factores fixos, tempo de exposição e concentração de propofol não é significativa,  $p=0,258$ . Os efeitos da concentração e do tempo de exposição vão ser analisados em separado. O efeito da concentração no Complexo IV/CS não é significativo,  $p=0,083$ , também o efeito do tempo de exposição não é significativo,  $p=0,132$ . O tempo de exposição e a concentração de propofol não têm qualquer influência no Complexo IV/CS.

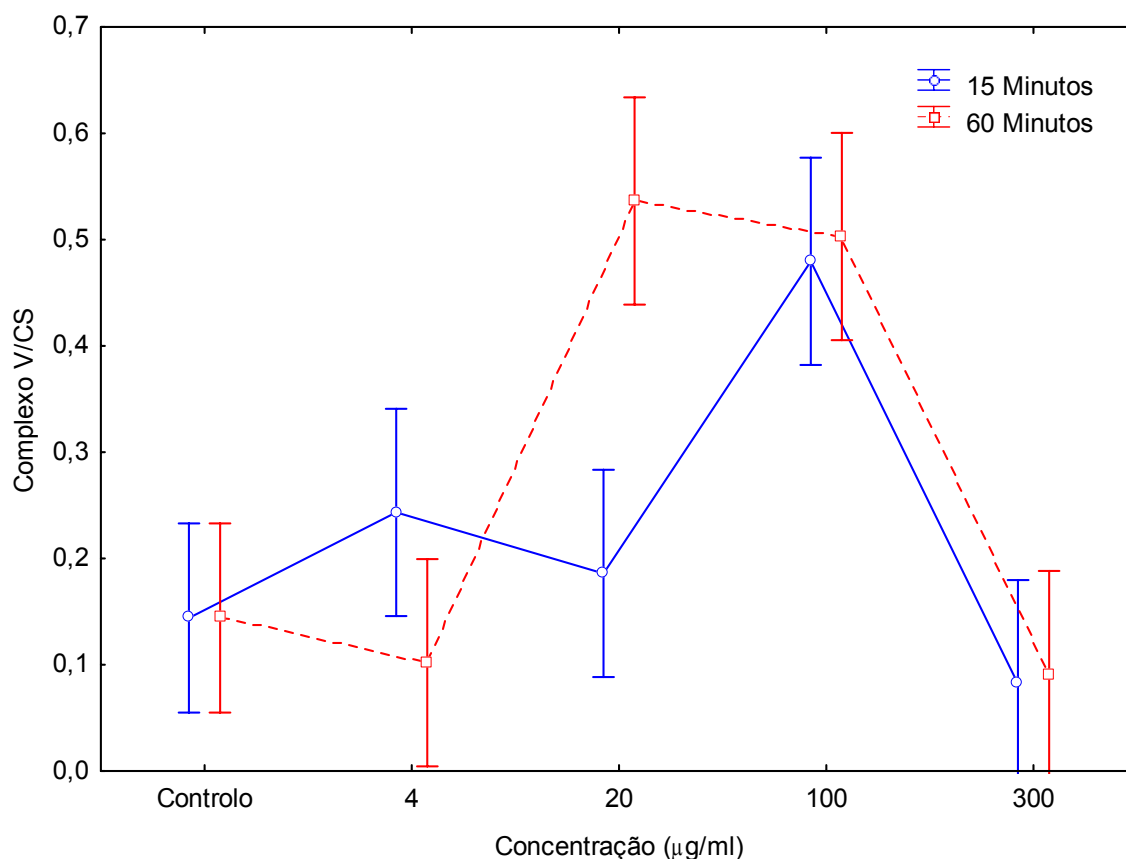
## Complexo V/CS

Relativamente à actividade do complexo V corrigida para a CS (figura 31), observou-se que para o tempo de exposição de 15 minutos, o complexo V/CS sofre oscilações muito ténues desde o controlo até à concentração 20  $\mu\text{g/ml}$  observando-se um aumento bastante acentuado na concentração 100  $\mu\text{g/ml}$ , a que se segue uma queda acentuada na concentração 300  $\mu\text{g/ml}$ .

Já para o tempo de exposição de 60 minutos, o complexo V/CS diminui ligeiramente desde o controlo até à concentração 4  $\mu\text{g/ml}$  observando-se um aumento bastante acentuado na concentração 20  $\mu\text{g/ml}$ , seguido de uma ligeira queda na concentração 100  $\mu\text{g/ml}$  e segue-se uma queda acentuada na concentração 300  $\mu\text{g/ml}$ . Observa-se que é atingido um valor máximo do complexo V/CS aos 15 na concentração 100  $\mu\text{g/ml}$  e 60 minutos nas concentrações 20 e 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Quando comparamos os valores do complexo V/CS nos dois instantes de tempo, notamos que o comportamento não é homogéneo em todas as concentrações. Os valores parecem idênticos nos dois tempos para as concentrações 0, 100 e 300  $\mu\text{g/ml}$ . No entanto, para a concentração 4  $\mu\text{g/ml}$  o complexo assume valores mais elevados aos 15 minutos e na concentração 20  $\mu\text{g/ml}$  o complexo assume valores mais elevados aos 60 minutos.





**Figura 31** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança para o a relação Complexo IV/CS, em cada tempo de observação, segundo as cinco concentrações de Propofol.

A análise factorial para os dados relativos à actividade do Complexo V/CS confirma que a interacção entre os dois factores fixos, tempos de exposição e concentração de propofol é significativa,  $p < 0,001$ . Assim, o efeito da concentração tem de ser estudado em separado para cada tempo de exposição e o efeito do tempo tem de ser estudado em separado para cada concentração.

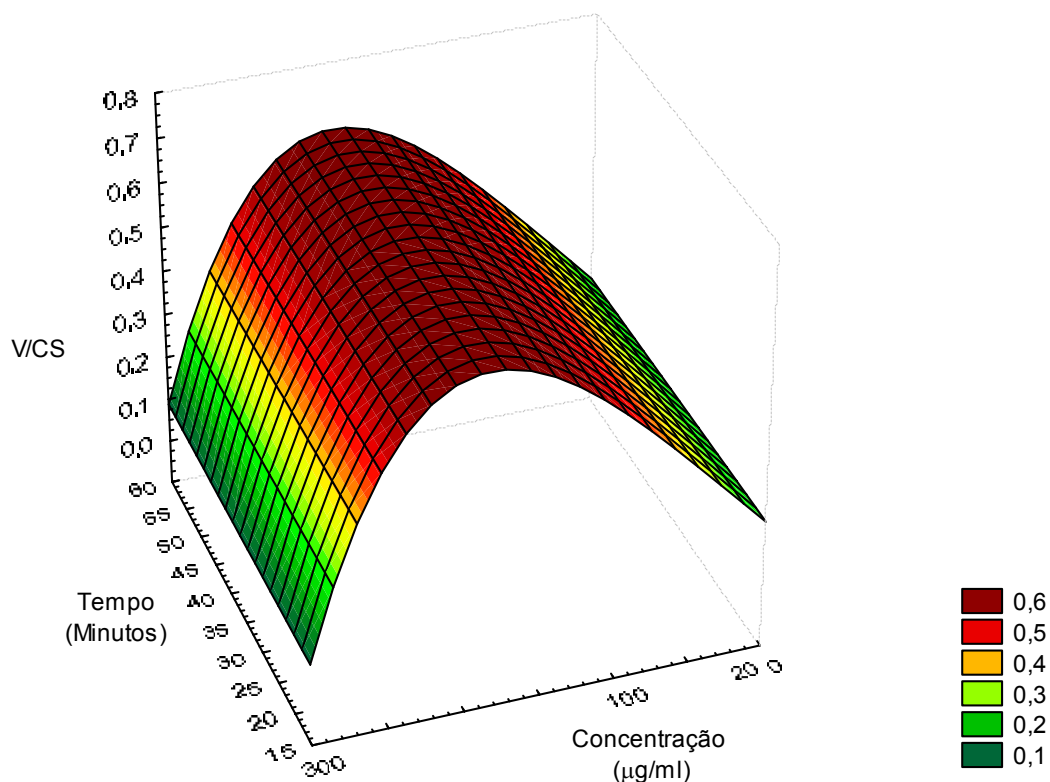
A partir das comparações múltiplas é possível verificar que aos 15 minutos de exposição, a concentração 100 μg/ml difere de todas as outras, excepto de 4 μg/ml,  $p < 0,001$  para 0 μg/ml,  $p = 0,050$  para 4 μg/ml,  $p = 0,006$  para 20 μg/ml e  $p < 0,001$  para 300 μg/ml. As restantes comparações a 15 minutos não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Aos 60 minutos as concentrações 20 e 100  $\mu\text{g/ml}$  não diferem entre si,  $p=1.000$ . Estas duas diferem das restantes três concentrações. Tanto para 20 como para 100  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0,001$  nas comparações com as outras três, 0, 4 e 300  $\mu\text{g/ml}$ .

Em cada concentração realizaram-se as comparações entre os dois tempos de exposição. Apenas a diferença na concentração 20  $\mu\text{g/ml}$  é estatisticamente significativa  $p < 0,001$ , as restantes não,  $p=1,000$  no controlo,  $p=0,358$  para 4  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p=1.000$  para 100  $\mu\text{g/ml}$  e  $p=1.000$  para 300  $\mu\text{g/ml}$ .

Realizaram-se ainda comparações entre cada uma das concentrações em relação ao controlo. Aos 15 minutos de exposição, da comparação do controlo com as concentrações 4, 20, 100 e 300  $\mu\text{g/ml}$  temos  $p=0,369$ ,  $p=0,935$ ,  $p < 0,001$  e  $p=0,995$  respectivamente. Aos 60 minutos de exposição o controlo difere de duas concentrações,  $p=0,996$  para 4  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0,001$  para 20  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0,001$  para 100  $\mu\text{g/ml}$  e  $p=0,999$  para 300  $\mu\text{g/ml}$ .

Como a interacção é significativa, é possível representar geometricamente a relação existente entre os dois factores fixos e o Complexo V/CS através de uma superfície de resposta a três dimensões (figura 32). A partir desta superfície, dado um valor para o tempo de exposição, em minutos, e um valor para a concentração, em  $\mu\text{g/ml}$ , é possível estimar o Complexo V/CS.



**Figura 32** - Representação gráfica tridimensional da superfície de resposta para relação V/Cs em função da concentração de propofol e tempo de observação.

Da análise da superfície pode concluir-se que os valores mais elevados da variável dependente são observados quando as concentrações estão entre 100 e 200  $\mu\text{g/ml}$  para qualquer valor do tempo. Os valores mais baixos são observados quando temos concentrações 0 ou 300  $\mu\text{g/ml}$  para qualquer tempo de observação.

Para todos os complexos foi testado o efeito do solvente do propofol, o intralipid e não se verificaram alterações estatisticamente significativas em relação ao controlo.

### **3.3 Influência do propofol na morte celular por apoptose**

Uma vez que não houve alterações da viabilidade celular para nenhuma das concentrações de propofol testadas, nos dois tempos de incubação considerados, não havia evidências de que pudesse estar a ocorrer morte celular por apoptose, nomeadamente porque não se observaram diferenças na libertação de LDH, comparativamente ao controlo. Nesse sentido, apesar de constar do plano inicial, não foram realizados os ensaios relativos à morte celular por apoptose.

### 3.4 Influência do propofol no número de cópias do mtDNA

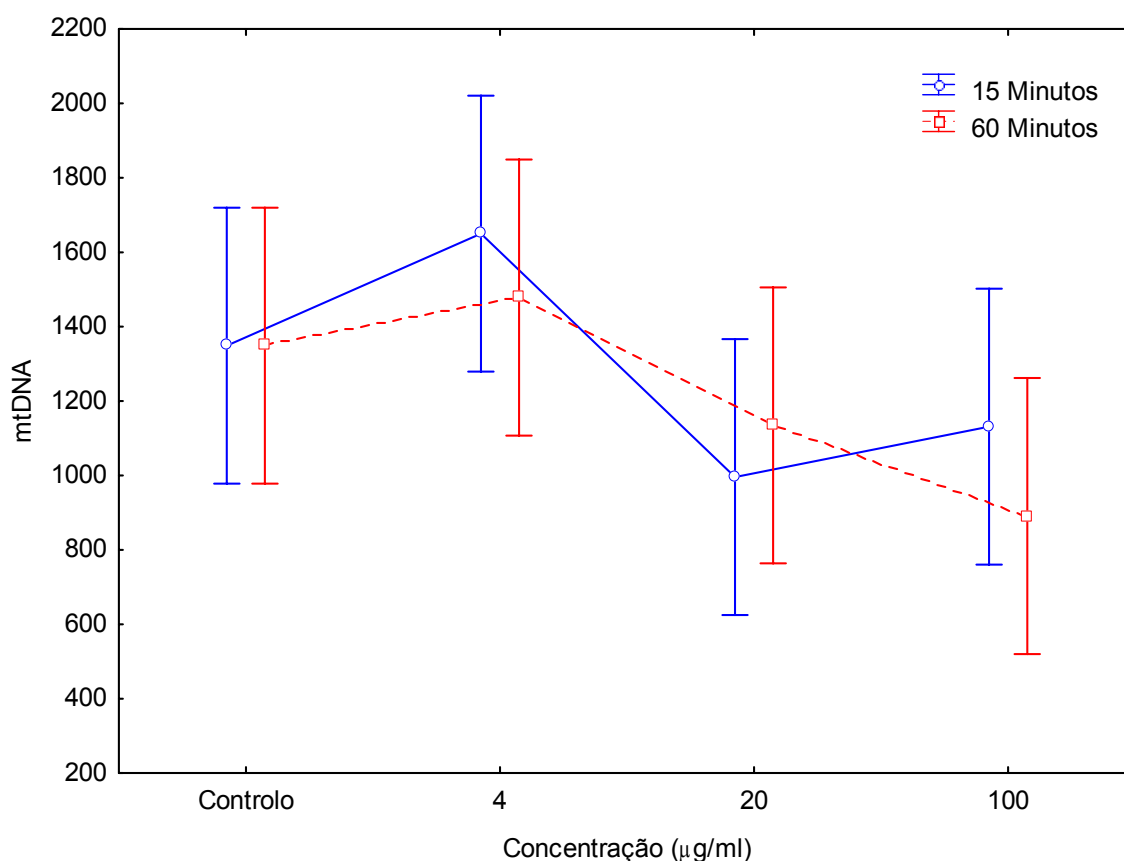
Na tabela 4 apresentamos os resultados da avaliação do número de cópias mtDNA, em resposta à incubação com diferentes concentrações de propofol, em dois tempos de exposição.

**Tabela 4** - Resultados da avaliação do número de cópias mtDNA, em resposta à incubação com diferentes concentrações de propofol, em dois tempos de exposição.

Nº de Cópias mtDNA			Concentração			
Tempo de Observação			0 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
			N=3	N=3	N=3	N=3
			Média $\pm$ DP Mín-Máx	Média $\pm$ DP Mín-Máx	Média $\pm$ DP Mín-Máx	Média $\pm$ DP Mín-Máx
15 Minutos			1348,84 $\pm$ 289,70 1054,94 - 1634,15	1649,98 $\pm$ 376,44 1344,44 - 2070,51	995,77 $\pm$ 166,07 804,01 - 1092,08	1131,24 $\pm$ 373,37 775,39 - 1519,95
60 Minutos			1348,84 $\pm$ 289,70 1054,94 - 1634,15	1478,05 $\pm$ 189,25 1304,18 - 1679,62	1134,62 $\pm$ 126,39 1020,98 - 1270,74	891,08 $\pm$ 454,36 368,50 - 1192,70

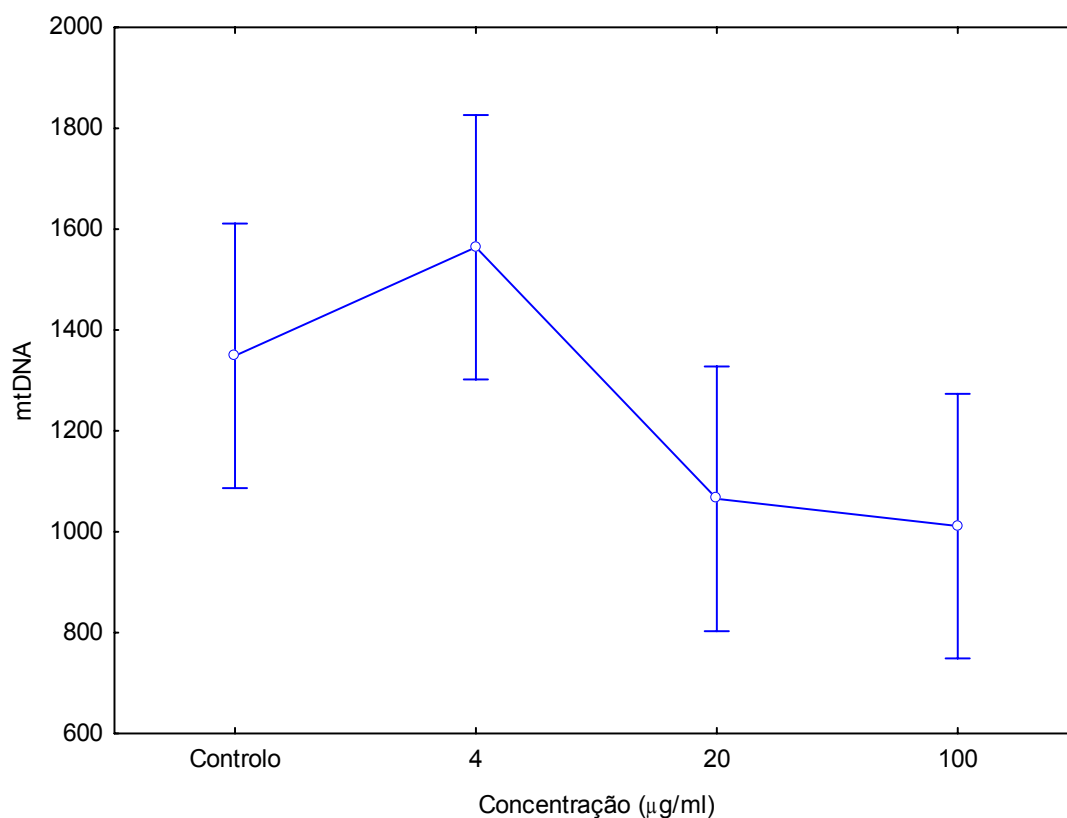
Observou-se que para o tempo de exposição de 15 minutos, o número de cópias aumenta muito ligeiramente entre o controlo e a concentração 4  $\mu\text{g/ml}$  observando-se uma diminuição bastante acentuada na concentração 20  $\mu\text{g/ml}$ , ao que se segue uma queda ligeira na concentração 100  $\mu\text{g/ml}$ . Já para o tempo de exposição de 60 minutos, o número de cópias sofre um aumento muito ténue entre o controlo até à concentração 4  $\mu\text{g/ml}$  observando-se depois uma diminuição gradual para a concentração 20  $\mu\text{g/ml}$  e posteriormente para a concentração 100  $\mu\text{g/ml}$  (figura 33).

Quando comparamos os valores do número de cópias mtDNA nos dois instantes de tempo, notamos que o comportamento é homogéneo em todas as concentrações, os valores são idênticos em todas as concentrações. Estes resultados levam à suspeita que os dois factores não interagem no seu efeito sobre o número de cópias mtDNA.



**Figura 33** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança para o número de cópias mtDNA, em cada tempo de observação, segundo as cinco concentrações de Propofol.

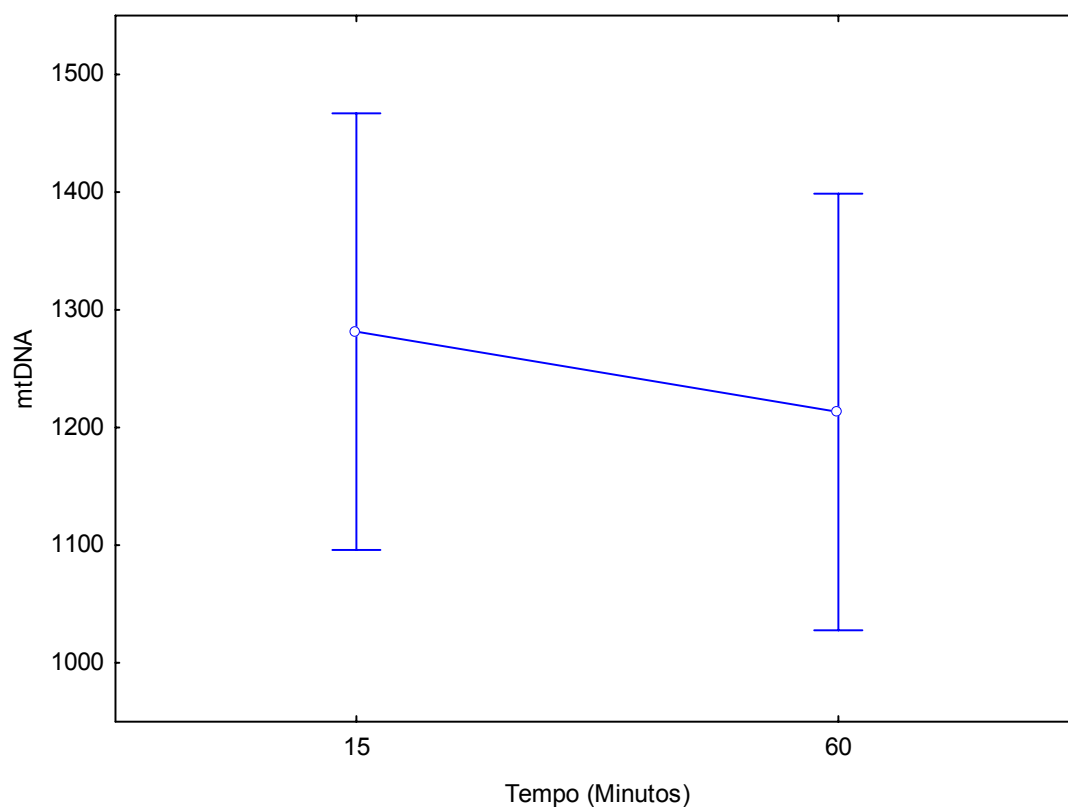
A análise factorial para os dados relativos ao número de cópias mtDNA revelou que a interacção entre os dois factores fixos, tempos de exposição e concentração de propofol não é significativa,  $p=0,702$ . Assim, os efeitos da concentração e do tempo de exposição são analisados em separado. O efeito da concentração é significativo,  $p=0,020$  e o efeito do tempo de exposição não é significativo,  $p=0,588$ . As figuras 34 e 35 apresentam os valores do número de cópias mtDNA em separado para a concentração e para o tempo de exposição.



**Figura 34** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança para o número de cópias mtDNA, em cada concentração de Propofol.

Recorreu-se às comparações múltiplas para saber quais as concentrações que diferem entre si. Apenas a concentração 100 mg/ml difere de 4 µg/ml,  $p=0,028$ . Todas as outras concentrações apresentam, entre si, valores iguais do número de cópias.

Da comparação de cada uma das concentrações em relação ao controlo concluiu-se que nenhuma delas difere deste,  $p=0,499$  para 4 µg/ml,  $p=0,280$  para 20 µg/ml,  $p=0,169$  para 100 µg/ml.

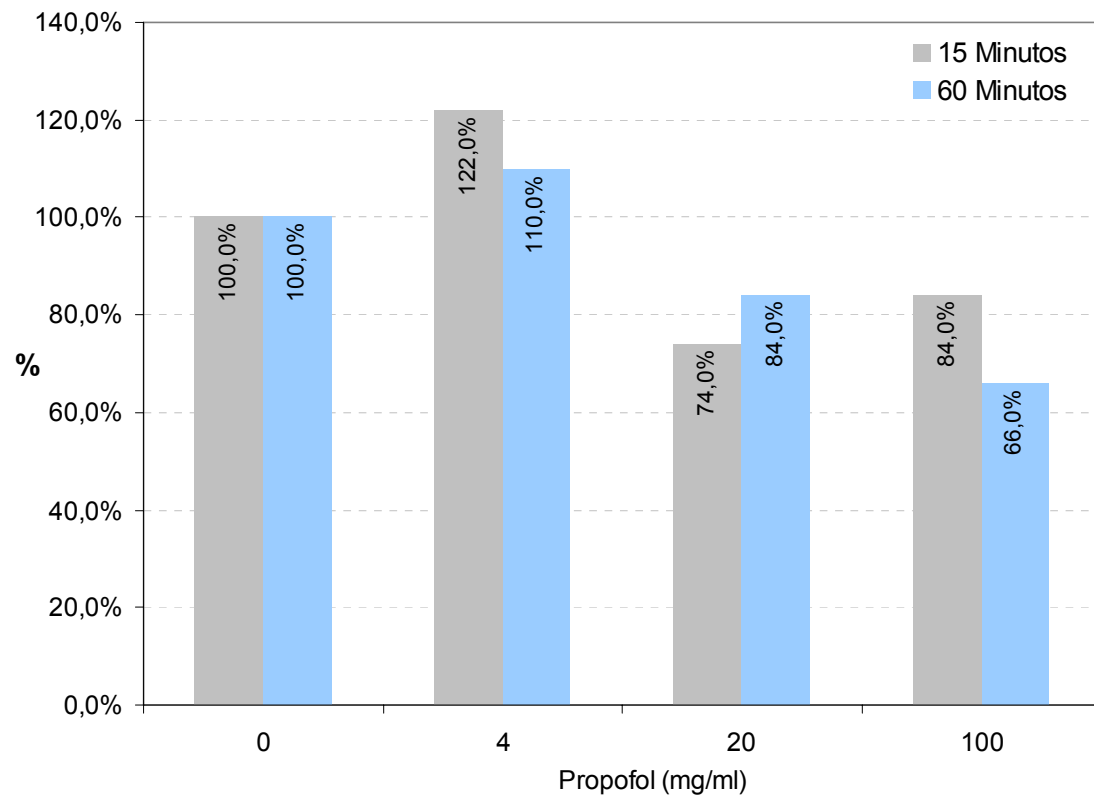


**Figura 35** - Médias amostrais e respectivos intervalos de confiança para o número de cópias mtDNA, em cada tempo de exposição.

A partir da figura 35, confirma-se que o tempo não tem efeito no número de cópias mtDNA.

A figura 36 apresenta a representação da percentagem do nº de cópias mtDNA para cada uma das concentrações em relação ao controlo





**Figura 36** - Representação da percentagem do nº de cópias mtDNA para cada uma das concentrações em relação ao controlo

## **4. Discussão**

A prática clínica sugere que existe uma grande heterogeneidade nas necessidades anestésicas, na forma como decorre o pós-operatório e nos efeitos secundários aos fármacos anestésicos. Com o crescimento dos conhecimentos na área da farmacogenética tornou-se evidente que algumas destas diferenças podem ser explicadas por factores genéticos.

A farmacogenética descreve a forma como as alterações nos genes moduladores da acção dos fármacos estão relacionadas com a variabilidade na resposta interindividual à terapêutica ou ao aparecimento de efeitos secundários, ou mesmo tóxicos.

Todos os anos, milhões de pessoas são expostas a anestésicos gerais quer seja para sedação, quer para anestesia geral. Normalmente, assume-se que os efeitos dos anestésicos são profundos e imediatos, mas completamente reversíveis. Este pressuposto tem sido colocado em causa desde que alguns estudos evidenciaram a existência de processos neurodegenerativos associados aos anestésicos gerais.

Os anestésicos gerais têm uma apresentação altamente lipossolúvel e conseguem atravessar facilmente todas as membranas, penetrar nos organelos e interagir com inúmeros constituintes celulares. Parecem interferir com a expressão genética, com a síntese proteica e com a função celular, mas os mecanismos subjacentes a estas acções ainda se encontram por esclarecer.

Os anestésicos endovenosos podem interferir com o metabolismo dos hidratos de carbono, o consumo de oxigénio e a produção de energia no sistema nervoso. No entanto, a forma como alteram a função mitocondrial ainda não foi clarificada. O propofol é o anestésico endovenoso mais utilizado.

A mitocôndria é reconhecida como a maior fonte de produção de energia, necessária para a actividade celular normal. A biogénese mitocondrial

representa um processo complexo, envolvendo uma série de vias sinalizadoras que regulam a expressão do genoma nuclear e mitocondrial. Além do seu papel crucial na produção de energia, a mitocôndria participa activamente noutros processos metabólicos como ciclo de Krebs, formação de ureia, síntese de heme e oxidação de ácidos gordos.

A função mitochondrial depende de proteínas codificadas quer pelo DNA nuclear quer pelo mtDNA e portanto, um funcionamento normal da cadeia respiratória requer um genoma mitocondrial intacto. Por sua vez, a função do mtDNA celular depende do número de cópias e da integridade de cada molécula de mtDNA.

Durante os últimos anos, a lesão mitocondrial tem sido reconhecida como causa de efeitos secundários de alguns fármacos e tóxicos. Assim, a mitocôndria representa um alvo para a toxicidade farmacológica uma vez que tem um papel na produção de energia celular e contém múltiplas vias metabólicas.

Os principais mecanismos de toxicidade dos fármacos ao nível mitocondrial envolvem a interferência directa na fosforilação oxidativa, inibição da oxidação dos ácidos gordos, inibição da replicação/transcrição do mtDNA e/ou a interferência com a síntese de proteínas, entre outros.

A mitocôndria acumula facilmente compostos lipofílicos catiónicos e ácidos fracos na sua forma aniónica. Como o propofol é apresentado nesta forma pode penetrar livremente pela MMI, acumulando-se no interior da mitocôndria e alterando a função mitocondrial. Por outro lado, os desacopoladores da OXPHOS são caracterizados por serem ácidos fracos hidrofóbicos (fenóis ou amidas). O propofol tem uma estrutura fenólica e poderá funcionar como desacopolador, em teoria.

Com base nestes pressupostos procedemos à avaliação da toxicidade do propofol ao nível do sistema energético mitocondrial e da sua possível interferência no número de cópias de mtDNA.

As concentrações plasmáticas de propofol durante a anestesia têm sido avaliadas entre os 15-22 $\mu$ M (o que corresponde aproximadamente a 4  $\mu$ g/ml) com algumas variações interindividuais (Vuyk et al., 1992) e com maiores concentrações durante a indução. No nosso estudo, utilizamos concentrações crescentes de propofol a partir dos 4  $\mu$ g/ml.

As células HeLa em cultura foram usadas como modelo para o estudo dos mecanismos de toxicidade do propofol, associados à função energética. As células foram cultivadas em concentrações crescentes de propofol, em dois tempos de incubação, 15 minutos e 1 hora. Estas células são uma linha celular bem conhecida e utilizada no estudo da citotoxicidade de alguns fármacos. Foi seleccionada para o nosso estudo, atendendo à elevada reprodutibilidade dos resultados e à correlação significativa com os resultados *in vivo*.

A análise de libertação da LDH permite inferir sobre a integridade membranar das células, sendo portanto um indicador de citotoxicidade. Verificou-se que a exposição às diferentes concentrações de Propofol não teve efeito na LDH libertada e que quanto mais prolongada foi a exposição, menor a libertação de LDH. Esta diminuição poderá ser explicada por fenómenos inerentes à metodologia.

Uma vez que não houve alterações da viabilidade celular para nenhuma das concentrações de propofol testadas, nos dois tempos de incubação considerados, não houve evidência de que pudesse ocorrer morte celular por apoptose, nomeadamente porque não se observaram diferenças, no aumento da libertação de LDH, comparativamente ao controlo.

A citrato sintetase é uma enzima que tem sido usada como marcadora de preparações mitocondriais, dada a sua estabilidade e o seu papel regulador no ciclo de Krebs. A sua actividade dá uma estimativa do número de mitocôndrias de uma determinada preparação e pode ser usada para uniformizar os resultados das actividades das enzimas da CRM (Grazina, 2004). Por este motivo, depois de estudar os complexos da CRM isoladamente, relacionou-se cada complexo com a actividade da citrato sintetase.

Relativamente à actividade do complexo I (figura 11) verifica-se que existe interacção entre os dois factores fixos, tempos de exposição e concentração de propofol ( $p=0,027$ ) mas o seu comportamento não é homogéneo em todas as concentrações. Para a concentração 100  $\mu\text{g/ml}$  com 15 minutos de incubação e para a concentração 20  $\mu\text{g/ml}$  com 60 minutos de incubação verifica-se um aumento da actividade do complexo I em relação ao controlo ( $p=0,004$  e  $p=0,012$  respectivamente). Quando se analisa a actividade do complexo I corrigida para a citrato sintetase, o comportamento é semelhante.

A diminuição da actividade do complexo I pode alterar a disponibilidade de ATP nas células e consequentemente uma miríade de funções celulares será alterada. Apesar de haver um estudo, em mitocôndrias de ratos, que provou que o propofol inibe o complexo I da CRM (Rigoulet et al., 1996), o nosso trabalho não evidencia qualquer inibição do complexo I, mesmo quando as células são expostas a altas concentrações de propofol. Verificamos, pelo contrário que a actividade aumenta, ocorrendo um estímulo do funcionamento do complexo I. Para esclarecer se o propofol traduz aumento da expressão dos transcritos das subunidades deste complexo enzimático, serão necessários estudos posteriores nesse sentido, uma vez que estes não faziam parte do âmbito deste trabalho.

O complexo II mantém a sua actividade quase constante para as diferentes concentrações de propofol testadas (figura 13), para o tempo de incubação de 15 minutos. Para a exposição de 60 minutos, a actividade começa por diminuir ligeiramente entre o controlo e a concentração 4  $\mu\text{g/ml}$ , aumentando

progressivamente até à concentração 100 µg/ml e seguindo-se uma diminuição na concentração 300 µg/ml. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes concentrações testadas e o controlo, relativamente a este complexo.

Na análise da actividade do complexo II corrigida para a CS, verifica-se que nos dois instantes de tempo o comportamento é idêntico nas concentrações 0, 100 e 300 µg/ml. Para a exposição de 15 minutos existe um aumento gradual da actividade deste complexo do controlo para a concentração 4 µg/ml e desta para a de 20 µg/ml, estatisticamente significativo ( $p=0,020$  e  $p=0,003$  respectivamente). Com o maior tempo de exposição, os resultados não diferem entre si.

Relativamente à actividade do complexo III verificou-se que aos 15 minutos de exposição, a concentração 100 µg/ml difere de todas as outras, com aumento da sua actividade; aos 60 minutos de exposição há um aumento da actividade na exposição a concentrações de 20 e 100 µg/ml, com  $p < 0,001$ , relativamente ao controlo (figura 16). O estudo da actividade do complexo III corrigida para a CS mostrou um comportamento semelhante.

A inibição do complexo III pode resultar na formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Não se observou qualquer resposta do tipo inibitório relativa a este complexo. Estes resultados estão de acordo com o facto de o propofol ser considerado um desacoplador (Johnson et al., 2003).

Quando comparamos os valores do complexo IV nos dois instantes de tempo, notamos que o comportamento é idêntico em todas as concentrações. Também para a actividade corrigida para a CS, tempo de exposição e a concentração de propofol não têm qualquer influência na actividade do Complexo IV.

Na actividade do complexo V (figura 20) ou ATP sintetase, observámos um aumento da actividade para a concentração 100 µg/ml aos 15 minutos de exposição, seguida de diminuição na concentração 300µg/ml, não sendo esta

diminuição estatisticamente significativa. Aos 60 minutos de exposição há um aumento de actividade nas concentrações 20 e 100  $\mu\text{g/ml}$ , com  $p < 0,001$ . Na relação com a CS o comportamento deste complexo foi semelhante. Apesar de vários estudos mostrarem o propofol provoca uma diminuição de ATP na célula, o nosso trabalho não evidencia qualquer inibição da capacidade de síntese de ATP. Existe algum papel inibitório deste fármaco mas só se verifica em concentrações muito superiores às utilizadas na prática clínica (300 $\mu\text{g/ml}$ ). Por outro lado, os aumentos que detectámos evidenciam antes uma estimulação da actividade da CRM para as concentrações superiores às utilizadas habitualmente em anestesia.

A natureza dos efeitos encontrados para a exposição a diferentes concentrações de propofol não é linear, verificando-se um comportamento heterogéneo. Para a concentração de 4 $\mu\text{g/ml}$ , normalmente não se observam diferenças em relação ao controlo. Verifica-se sempre um aumento da actividade dos complexos para as concentrações de 20 e de 100 $\mu\text{g/ml}$  e um decréscimo da actividade na concentração máxima (300 $\mu\text{g/ml}$ ), que é uma concentração muito alta, comparativamente com as que são utilizadas na prática clínica.

Para os complexos I, III e V construímos superfícies de resposta a três dimensões (figuras 12, 17, 21, 25, 29 e 32) onde representámos geometricamente a relação existente entre os factores tempo de exposição, concentração e actividade de cada complexo. Estes gráficos permitem estimar o comportamento da actividade de cada complexo para as diferentes condições. Estes resultados podem ser muito importantes na prática clínica, se houver casos em que seja necessário utilizar uma dose de anestésico mais elevada ou em que o tempo de exposição ao fármaco seja superior ao habitual. Por outro lado, é necessário prosseguir estes resultados replicando-os em células de doentes expostos ao fármaco, para verificar se os dados obtidos no presente trabalho são específicos do propofol ou se são únicos para esta linha celular. No entanto, consideramos que os resultados obtidos, pela sua



originalidade, representam um passo importante no esclarecimento da acção do propofol no sistema energético mitocondrial, pela importância crucial que a via da OXPHOS em ao nível da sobrevivência celular.

Concentrações elevadas de propofol induzem redução do número de cópias de mtDNA, tendo-se verificado uma redução estatisticamente significativa entre a concentração 4 e a 100µg/ml,  $p=0,028$ . Como o efeito do tempo não é significativo pela análise factorial dupla,  $p=0,588$ , ainda podemos referir que esta redução do número de cópias é independente do tempo de exposição.

Não encontramos na literatura, até à data dados relativos à acção do propofol no número de cópias de mtDNA. Esta será talvez a primeira evidência experimental da possível interferência do propofol na regulação da replicação do mtDNA, evidenciando um possível efeito epigenético deste fármaco. Será importante investigar se este efeito também ocorre em células de doentes sujeitos à anestesia (p.e. em células do sangue).

A transposição deste estudo para o organismo humano poderá fornecer dados muito interessantes na medida em que diferentes genótipos mitocondriais poderão estar relacionados com diferentes respostas aos anestésicos, nomeadamente no que diz respeito a possíveis efeitos tóxicos ou eficácia.

O maior risco de alterações cognitivas pós-operatórias, associadas aos anestésicos gerais, ocorre em pessoas de idade mais avançada, mas os mecanismos envolvidos neste evento não são ainda conhecidos. Sabe-se que no idoso, há uma redução do número de cópias de mtDNA. Nesse sentido a avaliação do número de cópias de mtDNA em pessoas de diferentes idades expostas ao propofol seria um trabalho interessante a desenvolver no futuro.

A toxicidade induzida pelo propofol pode ser clinicamente relevante quando este for utilizado por longos períodos ou em doentes com défices da CRM. Por

este motivo, seria também interessante estudar o efeito do propofol em células de doentes com citopatia mitocondrial, portadores de défices da OXPHOS e/ou com mutação do mtDNA.

As citopatias mitocondriais são doenças que resultam de défices na CRM e incluem casos associados a alterações do mtDNA, nomeadamente à redução do número de cópias (depleção). Ao ser usado na anestesia de um doente com uma disfunção do sistema energético mitocondrial e/ou com síndrome de depleção, o propofol poderá induzir efeitos adversos importantes. Estudar a acção do propofol em células destes doentes permitiria compreender melhor o mecanismo de acção do propofol ao nível mitocondrial.

Por outro lado, seria também relevante estudar períodos de incubação mais longos, superiores a 24 horas, uma vez que se utilizam clinicamente para sedação em cuidados intensivos.

Este estudo revela-se de grande importância para determinar as condições de estudo na investigação dos efeitos dos anestésicos em células humanas de indivíduos sujeitos a anestesia. Consideramos que este trabalho representa uma contribuição positiva para o esclarecimento dos mecanismos de acção dos anestésicos, em particular do propofol, e dos seus efeitos no metabolismo mitocondrial energético.

Os resultados obtidos no presente trabalho devem ser interpretados com as reservas inerentes às suas limitações, na medida em que as células HeLa são muito úteis para modelos de estudos *in vitro* mas a transposição dos resultados para organismos *in vivo* não é linear. Apesar deste estudo ser realizado em células de origem humana, a exposição directa ao anestésico, por submersão, pode determinar algumas limitações na interpretação dos resultados e a sua transposição para o que se passa ao nível fisiológico. É de ter em conta, não só a equipotência das doses para as quais as possíveis alterações se verificam, mas também os efeitos do tipo de exposição.

Por outro lado, alterações do mtDNA numa linha celular não reflectem exactamente o que acontece em todos os tipos de células e existe grande variabilidade interindividual do mtDNA, bem como ao nível dos diferentes tecidos no mesmo indivíduo (heteroplasma).

No entanto, deve ter-se em conta que a investigação em doentes não é fácil, especialmente porque o DNA mitocondrial é heteroplásmico e este estado é alterado em cultura. As questões éticas inerentes aos estudos genéticos em doentes também não podem ser ignoradas.

Estudos futuros deverão incluir a investigação do efeito do propofol em modelos *in vivo*, nomeadamente através de estudos de células sanguíneas, por exemplo linfócitos de doentes anestesiados com propofol. Contudo, a complexidade dos estudos *in vivo* torna a elucidação destes mecanismos difícil de atingir.

## **5. Conclusões finais**

O nosso estudo foi desenhado para avaliar os efeitos *in vitro* da acção do propofol no sistema energético mitocondrial e na expressão genética mitocondrial, em células HeLa, de forma a relacionar possíveis alterações com efeitos ao nível da farmacogenética.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que o propofol altera o metabolismo bioenergético nas células HeLa, verificando-se um aumento da actividade dos complexos da CRM para as concentrações 20 e 100µg/ml e diminuição da actividade dos complexos da CRM para a exposição a elevadas concentrações de propofol (300µg/ml).

Concentrações elevadas de propofol induzem redução do número de cópias de mtDNA, tendo-se verificado uma redução estatisticamente significativa entre a concentração 4 e a 100µg/ml,  $p=0,028$  e esta redução do número de cópias é independente do tempo de exposição.

Acreditamos que o presente trabalho revela informações importantes no sentido de um melhor entendimento da acção do propofol no sistema energético mitocondrial. No entanto, várias questões ficam em aberto e esperamos poder vir a desenvolver outros estudos que possam ajudar a clarificar os mecanismos de acção e toxicidade do propofol. Destaca-se ainda o facto de termos utilizado ferramentas estatísticas adequadas aos resultados obtidos, o que representa uma valorização adicional dos dados laboratoriais.

Por outro lado, persiste uma questão que nos desassossega e à qual gostaríamos de poder vir a responder no futuro: quais os factores que determinam a ocorrência de SIP apenas em alguns indivíduos? Perceber e explicar esta dicotomia, tendo em conta a replicação, aparentemente aleatória das mitocôndrias é um dos nossos objectivos no futuro.



## **6. Bibliografia**

- Acco A, Comar JF, Bracht A. Metabolic effects of propofol in the isolated perfused rat liver. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004, 95(4):166-174.
- Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species; *Trends in Pharmacological Sciences* 2006, 27 (12): 639-645.
- Armstrong J. Mitochondrial Medicine. Pharmacological targeting of mitochondria in disease. *Br J Pharmacol*. 2007, 151(8): 1154–1165.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981, 290(5806): 457-465.
- Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol*. 1988; 4: 289–333.
- Barash P, Cullen B, Stoelting R, Cahalan M, Stock M: *Clinical Anesthesia*, 6th edition 2009. Lippincott Williams & Wilkins, Capitulo 7: 133-145
- Bains R, Moe MC, Vinje ML, Berg-Johnsen. Sevoflurane and propofol depolarize mitochondria in rat and human cerebrocortical synaptosomes by different mechanisms. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 2009 Nov, 53(10):1354-60.
- Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, Rossignol R. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci*. 2007, 120(5): 838-48.
- Bridges MT, Introna RP, Pruett JK. Concentration ranges in dose-response determinations for propofol and thiopental in vitro. *Anesthesiology* 1993 Jun, 78(6):1187.
- Branca D, Vincenti E, Scutari G. Influence of the anesthetic 2,6-diisopropylphenol (propofol) on isolated rat heart mitochondria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 1995, 110 (1): 41-45.
- Burnie JP. Molecular mechanisms of general anaesthesia. *Anaesthesia* 1981, 36 (11), 1027–1039.
- Cattano D. Subanesthetic doses of propofol induce neuroapoptosis in the infant mouse brain. *Anesth Analg* 2008, 106 (6): 1712-1714.
- Cardoso SM, Santana I, Swerdlow RH, Oliveira CR. Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances Abeta toxicity. *J Neurochem*. 2004, 89(6): 1417-1426.



- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979, 59: 527–605.
- Chang HC, Tsai SY, Wu GJ, Lin YH, Chen RM, Chen TL. Effects of propofol on mitochondrial function and intracellular calcium shift in bovine aortic endothelial model. *Acta Anaesthesiol Sin* 2001, 39(3): 115-122.
- Chen RM, Wu CH, Chang HC, Wu GJ, Lin YL, Sheu JR, Chen TL. Propofol suppresses macrophage functions and modulates mitochondrial membrane potential and cellular adenosine triphosphate synthesis. *Anesthesiology*. 2003; 98(5):1178-85.
- DiMaggio CJ, Sun L, Kakavouli A, Guoha L. Exposure to anesthesia and the risk of developmental and behavioral disorders in young children. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting 2008, Abstr. #A1415. Available at: [www.asaabstracts.com](http://www.asaabstracts.com). Accessed September 1, 2009
- Engelhard K, Werner C, Eberspächer E, Pape M, Blobner M, Hutzler P, Kochs E. Sevoflurane and propofol influence the expression of apoptosis-regulating proteins after cerebral ischaemia and reperfusion in rats. *Eur J Anaesthesiol* 2004, 21(7): 530-537.
- Ezri T, Sessler D, Weisenberg M, et al: Association of ethnicity with the minimum alveolar concentration of sevoflurane. *Anesthesiology* 2007, 107 (1): 4-5.
- Gey GO, Bang FB, Gey MK. Responses of a variety of normal and malignant cells to continuous cultivation, and some practical applications of these responses to problems in the biology of disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1954; 58(7): 976-999.
- Gey GO, WD Coffman, MT Kubicek. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 1952; 12: 264-265.
- Grazina MMM. Genoma Mitocondrial e Défice Energético no Diagnóstico das Doenças da Cadeia Respiratória Mitocondrial (Tese de Doutorado), 2004.
- Guo J, Lemire BD. The ubiquinone-binding site of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate-ubiquinone oxidoreductase is a source of superoxide. *J Biol Chem*. 2003, 278: 47629–47635.
- Hemmings HC Jr, Akabas MH, Goldstein PA, Trudell JR, Orser BA, Harrison NL. Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action. *Trends Pharmacol Sci*. 2005, 26(10): 503-10.

- Homanics GE, Ferguson C, Quinlan JJ, et al: Gene knockout of the alpha6 subunit of the gammaaminobutyric acid type A receptor: lack of effect on responses to ethanol, pentobarbital, and general anesthetics. *Mol Pharmacol* 1997, 51: 588.
- Ioanna Vasileiou, Theodoros Xanthos, Eleni Koudouna, Despoina Perrea, Chris Klonaris, Athanasios Katsargyris and Lila Papadimitriou. Propofol: A review of its non-anaesthetic effects. *European Journal of Pharmacology* 2009, 605 (1-3): 1-8.
- Johnson JA, Lima JJ. Drug receptor/effector polymorphisms and pharmacogenetics: current status and challenges. *Pharmacogenetics*. 2003, 13(9):525-534.
- Jurd R, Arras M, Lambert S, et al: General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA (A) receptor beta3 subunit. *Faseb J* 2003; 17: 250.
- Kalow W, Staron N. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. *Can J Biochem Physiol* 1957, 35: 1305–1320.
- Kalow W. Pharmacogenetics and anesthesia. *Anesthesiology* 1964, 25: 377–87.
- Kayser EB, Morgan PG, Hoppel CL, Sedensky MM. Mitochondrial expression and function of GAS-1 in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*. 2001, 276(23): 20551-20558.
- Kayser E-B, Morgan PG, Sedensky MM. Mitochondrial complex I function affects halothane sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Anesthesiology*. 2004, 101 (2): 365-372.
- Kendall B. Wallace. Mitochondrial off targets of drug therapy. *Trends in Pharmacological Sciences* 2008. 29 ( 7): 361-366
- Kikuchi T, Wang Y, Sato K and Okumura F. In vivo effects of propofol on acetylcholine release from the frontal cortex, hippocampus and striatum studied by intracerebral microdialysis in freely moving rats. *British Journal of Anaesthesia*. 1998, 80 (5): 644-648.
- Kidambi S, Yarmush J, Fong W, Kamath S, SchianodiCola J and Nahmias Y. Propofol induces ERK-dependant expression of c-Fos and Egr-1 in neuronal cells. *Neuroreport*. 2009, 20(7): 657–662.
- Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods*. 1987, 20:83–90.

- Kohro S, Hogan QH, Nakae Y, Yamakage M, Bosnjak ZJ. Anesthetic effects on mitochondrial ATP-sensitive K channel *Anesthesiology*. 2001, 95(6):1435-340.
- Krasowskia MD, Nishikawac K, Nikolaevaa N, et al. Methionine 286 in transmembrane domain 3 of the GABAA receptor  $\beta$  subunit controls a binding cavity for propofol and other alkylphenol general anesthetics. *Neuropharmacology* 2001, 41( 8): 952-964.
- Kyriakouli, Boesch, Taylor and Lightowlers. Progress and prospects: gene therapy for mitochondrial DNA disease *Gene therapy for mitochondrial DNA disease* *Gene Therapy* 2008, 15, 1017-1023.
- Lambert AJ, Brand MD. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondria. NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem* 2004, 279: 39414–39420.
- Lewis W, Kohler JJ, Hosseini SH, Haase CP, Copeland WC, Bienstock RJ, Ludaway T, McNaught J, Russ R, Stuart T, Santoianni R. Antiretroviral nucleosides, deoxynucleotide carrier, and mitochondrial DNA: Evidence supporting the DNA pol  $\gamma$  hypothesis. *AIDS* 2006, 20:675–684.
- Lingamaneni R, Birch ML, and Hemmings HC Widespread inhibition of sodium channel-dependent glutamate release from isolated nerve terminals by isoflurane and propofol. *Anesthesiology* 2001, 95:1460–1466.
- Luglia A, Spencer C and Kindlerc C. Anaesthetic mechanisms: update on the challenge of unravelling the mystery of anaesthesia. *European Journal of Anaesthesiology* 2009, 26:807–820.
- Falk MJ, Kayser E-B, Morgan PG, Sedensky MM. Mitochondrial Complex I Function Modulates Volatile Anesthetic Sensitivity in *C. elegans*. *Curr Biol*. 2006, 16 (16):1641-1645.
- McCrae A, Gallaher E, Winter P, Firestone L. Volatile anesthetic requirements differ in mice selectively bred for sensitivity or resistance to diazepam: implications for the site of anesthesia. *Anesth Analg* 1993, 76:1313–1317.
- Madhavan M, Kumar R, Krishnan K. Genetics of anesthetic response: autosomal mutations that render *Drosophila* resistant to halothane. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2000, 67:749–757.
- Marian M, Parrino C, Leo AM, Vincenti E, Bindoli A, Scutari G: Effect of the intravenous anesthetic 2,6-diisopropylphenol on respiration and energy production by rat brain synaptosomes. *Neurochem Res* 1997, 22:287–292.

- Meyer HH. Welche Eigenschaft der Anaesthetica bedingt ihre narkotische Wirkung? Arch Exper Pathol Pharmacol 1899, 42: 109–119.
- Moller JT, Cluitmans P, Rasmussen LS, Houx P, Rasmussen H, Canet J, Rabbitt P, Jolles J, Larsen K, Hanning CD, Langeron O, Johnson T, Lauven PM, Kristensen PA, Biedler A, van Beem H, Fraidakis O, Silverstein JH, Beneken JE, Gravenstein JS: Long-term postoperative cognitive dysfunction in the elderly ISPOCD1 study. ISPOCD investigators. International Study of Post-Operative Cognitive Dysfunction. Lancet 1998; 351:857–861.
- Moss GW, Lieb WR, Franks NP. Anesthetic inhibition of firefly luciferase, a protein model for general anesthesia, does not exhibit pressure reversal. Biophys J. 1991, 60(6): 1309–1314.
- Munnich A, Le Merrer M, Chauvet ML, Frezal J. Genetic diseases in mapping gene databases, genome interactive databases (GID)]. Arch Pediatr. 1996, 3 Suppl 1:347.
- Nelson DL, Cox MM. Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation, in: Lehninger Principles of Biochemistry, Nova Iorque, Worth Publishers, 2000, 19: 659–721.
- Nouette-Gaulain K, Quinart A, Letellier T, Sztark F. Mitochondria in anaesthesia and intensive care; Ann Fr Anesth Reanim. 2007, 26(4):319-33.
- Overton CE. Studien über die Narkose. Jena: G. Fischer, 1901.
- Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N, Taylor G, Sherer T, Greenamyre JT. Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. J Biol Chem. 2005, 280: 42026–42035.
- Protti A, Singer M. Bench-to-bedside review: Potential strategies to protect or reverse mitochondrial dysfunction in sepsis-induced organ failure. Critical Care 2006, 10:228.
- Rigoulet M, Devin A, Avéret N, Vandais B, Guérin B. Mechanisms of inhibition and uncoupling of respiration in isolated rat liver mitochondria by the general anesthetic 2,6-diisopropylphenol. European journal of biochemistry 1996, 241: 280-285.
- Roberto Scatena, Patrizia Bottoni, Giorgia Botta, Giuseppe E. Martorana, and Bruno Giardina. Am J Physiol Cell Physiol 2007, 293: C12–C21.
- Rodrigues CM, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan G, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting

- mitochondrial membrane depolarization and channel formation. *Cell Death Differ.* 1999, 6(9):842-854.
- Rudolph U, Crestani F, Benke D, et al: Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature* 1999; 401: 796.
- Satoh M, Kuroiwa T. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Experimental Cell Research* 1991, 196: 137-140.
- Scatena R, Bottoni P, Botta G, Martorana GE, Giardina B. The role of mitochondria in pharmacotoxicology: a reevaluation of an old, newly emerging topic. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007, 293(1): C12-21.
- Scheffter, I.E. *Mitochondria* 1999. Wiley-Liss, New York, NY.
- Shao H, Li J, Zhou Y, Ge Z, Fan J, Shao Z, Zeng Y. Dose-dependent protective effect of propofol against mitochondrial dysfunction in ischaemic/reperfused rat heart: role of cardiolipin. *British Journal of Pharmacology* 2008. 153:1641–1649.
- Short TG, Young Y. Toxicity of intravenous anaesthetics. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2003, 17(1): 77-89.
- Stephan KraEhenbuEhl. Mitochondria: important target for drug toxicity? *Journal of Hepatology.* 2001, 34: 334-336.
- Thorsten K, Jansena L, Scholzb J, Böttchera H, Wappler F, Burmeister M. Propofol anesthesia in children does not induce sister chromatid exchanges in lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2003, 542(1-2): 59-64.
- Tomioka S and Nakajo N. No genotoxic effect of propofol in Chinese hamster ovary cells: Analysis by sister chromatid exchanges. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 2001, 44(10): 1261-1265.
- Toogood PL. Mitochondrial drugs. *Curr Opin Chem Biol.* 2008, 12 (4):457-63.
- Urban BW & Bleckwenn M. Molecular and Basic Mechanisms of Anaesthesia. *British Journal of Anaesthesia* 2002, 89(1): 3-16.
- Van Swinderen B, Galifianakis A, Crowder M. Common genetic determinants of halothane and isoflurane potencies in *Caenorhabditis elegans*. *Anesthesiology* 1998, 89:1509–17.
- Vuyk, J, Engbers, F, Lemmens H, Pharmacodynamics of Propofol in Female Patients. *Anesthesiology* 1992, 77: 3-9.
- Wallace, D.C. Mitochondria as chi. *Genetics* 2008, 179: 727–735.

- Westphalen RI, Hemmings Jr HC. Effects of isoflurane and propofol on glutamate and GABA transporters in isolated cortical nerve terminals. *Anesthesiology*. 2003, 98(2): 364-372.
- Wilder RT, Flick RP, Sprung J, Katusic SK, Barbaresi WJ, Mickelson C, Gleich SJ, Schroeder DR, Weaver AL, Warner DO. Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a populationbased birth cohort. *Anesthesiology* 2009;110:796–804.
- Wolf A, Weir P, Segar P, Stone J, Shield J. Impaired fatty acid oxidation in propofol infusion syndrome. *The Lancet* 2001, 357(9256): 606-607.
- Wong SM, Cheng G, Homanics GE, Kendig JJ: Enflurane actions on spinal cords from mice that lack the beta3 subunit of the GABA(A) receptor. *Anesthesiology* 2001; 95: 154.